

VERGLEICHENDE ANALYSE VON
RHIZOBIUM LUPINI-LIPOPOLYSACCHARIDEN

von
Günter Lodderstaedt
aus
Fürth/Bay.

1979
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0047

VERGLEICHENDE ANALYSE VON RHIZOBIUM LUPINI-LIPOPOLYSACCHARIDEN

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Günter Lodderstaedt

aus

Fürth/Bay.

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1979

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof.Dr.H.Wegener

Erstberichtserstatter: Prof.Dr.W.Heumann

Zweitberichtserstatter: Univ.-Doz. Dr.W.Lotz

Inhalt	Seite
I. <u>Zusammenfassung</u>	1
II. <u>Einleitung</u>	3
III. <u>Material und Methoden</u>	6
1. Medien	6
2. Bakterienstämme	6
3. Bakteriophagen	7
4. INCO-Isolierung und -Reinigung	7
5. Isolierung und Reinigung von LPS	8
6. Test auf Rezeptoraktivität	8
7. Modifikation der LPS-Struktur mit spezi- fisch wirkenden Agentien	9
8. Analytische Methoden	10
8.1. Quantitative Farbreaktionen	10
Phenol-Schwefelsäure-Test	10
KDO-Bestimmung	10
Hexosamin-Bestimmung	11
Rhamnose-Bestimmung	11
Phosphat-Bestimmung	12
Acetylgruppenbestimmung	12
Pyruvatgruppenbestimmung	12
8.2. Dünnschichtchromatographie	13
Hydrolyse	13
Chromatographie	13
Nachweis der Zucker	13
8.3. Gaschromatographie	14
Gaschromatographische Fettsäurebestimmung	14
Gaschromatographische Zuckerbestimmung	14
8.4. Gelchromatographische Molekulargewichts- bestimmung	15
Isolierung der Zuckerketten	15

	Seite
Chromatographie	15
8.5. SDS-Gelelektrophorese	16
Anfärbung der LPS	16
Elektrophoretische Auftrennung	16
9. Serologische Methoden	16
Herstellung von Antiseren	16
Hämagglutinationshemmtest	17
Ouchterlony-Immundiffusion	18
10. Elektronenmikroskopie	18
IV. <u>Ergebnisse</u>	19
1. Die LPS der aus Lupinenknöllchen isolierten Bakterienstämme 16-2 und <u>R.lupini D75</u>	19
1.1. Das 16-2-LPS	19
1.1.1. Isolierung und Reinigung	19
1.1.2. Gaschromatographische Bestimmung des Fettsäuregehalts	20
1.1.3. Zucker- und Phosphatgehalt	20
1.1.4. Untersuchung der Polysaccharid-Seitenkette	23
1.1.4.1. Gelchromatographische Reinigung und Bestimmung des Molekulargewichts	23
1.1.4.2. Zusammensetzung des Polysaccharids	26
1.1.4.3. Zusammensetzung des Kern-Oligosaccharids	26
1.1.4.4. Aufbau der Zuckerkette	29
1.2. Das LPS von <u>R.lupini D75</u>	31
1.2.1. Isolierung und Reinigung	31
1.2.2. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren	32
1.2.3. Zucker- und Phosphatgehalt	34
1.2.4. Untersuchung der Zuckerseitenkette	34
1.2.4.1. Gelchromatographische Bestimmung des Molekulargewichts	34

	Seite
1.2.4.2. Chemische Zusammensetzung des Oligo- saccharid-Teils	36
1.3. Wechselwirkung des D75-LPS mit einem aus Lupinensamen isolierten Agglutinin	41
2. Die Wechselwirkung zwischen 16-2-LPS und INCO-Partikeln	42
2.1. Quantitativer Ausbau des Testsystems zur Bestimmung der INCO-Aktivität	42
2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen INCO-Partikeln und 16-2-LPS	43
2.3. Rezeptoraktive Region des INCO-Phagen auf dem 16-2-LPS	48
2.3.1. Strukturelle Voraussetzungen für die Re- zeptoraktivität	48
2.3.2. Die LPS INCO-resistenter Mutanten	51
2.3.2.1. Isolierung INCO-resistenter Mutanten	52
2.3.2.2. Serologischer Vergleich von Wildtyp- und Mutanten-LPS	52
2.3.2.3. Gaschromatographische Analyse der Neutral- zucker aus ausgewählten Mutanten-LPS	55
2.3.2.4. Das LPS des Mutantenstammes 16-2/I1	60
V. <u>Diskussion</u>	62
1. Die LPS der Stämme 16-2 und <u>R.lupini</u> D75	62
1.1. Aufbau der LPS	62
1.2. Verwandtschaftsgrad von 16-2-LPS und D75-LPS	66
1.3. Vergleich mit den LPS von Rhizobien und anderen Bodenbakterien	67
1.4. Ausblick	69

	Seite
2. Die Wechselwirkung zwischen 16-2-LFS und INCO	70
2.1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	71
2.2. Rezeptoraktive Region für den INCO-Phagen	72
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	74

Abkürzungen

LPS	Lipopolysaccharid
smooth-LPS	LPS, bestehend aus Lipoid A, core und O-spezifischer Seitenkette
rough-LPS	LPS, bestehend aus Lipoid A und core
semirough-LPS	LPS, bestehend aus Lipoid A, core und einer repeating unit
PS	Polysaccharid
OS	Oligosaccharid
EPS	extrazelluläres Polysaccharid
Hep	Heptose
KDO	2-Keto-3-desoxy-octonsäure
Glu	Glucose
Man	Mannose
Gal	Galactose
Xyl	Xylose
Rha	Rhamnose
GlcNH ₂	Glucosamin
PO ₄	Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
DOC	Desoxycholat
E ₄₈₅	Extinktion bei Wellenlänge 485 nm
OD ₆₂₀	Optische Dichte bei 620 nm
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

Falls nicht anders angegeben, bezeichnen alle Prozentangaben den Gewichtsanteil (w/w).

1. Zusammenfassung

Die Lipopolysaccharide (LPS) der beiden aus Wurzelknöllchen von Lupinen isolierten Bakterienstämme 16-2 und Rhizobium lupini D75 wurden mit gas- und dünnsticht-chromatographischen Methoden und mit Hilfe spezifischer Farbttests analysiert. Daneben wurde die Wechselwirkung des 16-2-LPS mit einem defekten Bakteriophagen (INCO) untersucht.

Das 16-2-LPS ist ein "smooth"-LPS. Es besteht aus einem Lipoid A, das Glucosamin und die Fettsäuren β -Hydroxymyristinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure sowie eine Hexadecensäure enthält, und einer Zuckerkette vom Molekulargewicht 8000 D, als deren Komponenten KDO, Heptose, Glucose, Mannose und Rhamnose identifiziert wurden. Der Phosphatgehalt beträgt 2,0 %. Das Kern-Oligosaccharid des LPS hat ein Molekulargewicht von 900 D und ist aus KDO, Heptose, Glucose, Mannose, Phosphat und möglicherweise Glucosamin aufgebaut; die O-spezifische Seitenkette besteht ausschließlich aus Rhamnose, die mit 37 % den Hauptbestandteil des 16-2-LPS ausmacht.

Das LPS des effektiv nodulierenden Stammes R. lupini D75 ist ein "rough"- oder "semirough"-LPS, dessen Lipoid A neben Glucosamin als Hauptbestandteile β -Hydroxymyristinsäure und zwei weitere längerkettige Fettsäuren, möglicherweise β -Hydroxypalmitinsäure und β -Hydroxystearinsäure, enthält. Die Zuckerkette des D75-LPS ist ein Oligosaccharid mit einem gelchromatographisch bestimmten Molekulargewicht von 1400 D, in dem die Komponenten Rhamnose, Xylose, Mannose, Galactose, Glucosamin und Phosphat im molaren Verhältnis 5 : 1 : 1 : 1 : 1 : 2 zu finden sind.

D75-LPS reagiert nicht mit einem kürzlich aus Samen von Lupinus angustifolius isoliertem Hamagglutinin (BRÜCKNER, 1979).

Die Inaktivierung eines phagenschwanzähnlichen Bacteriocins (INCO) durch isoliertes 16-2-LPS beruht auf der Adsorption der INCO-Phagen an das LPS und einer dadurch ausgelösten Kontraktion des defekten Bakteriophagen. Diese Wechselwirkung zwischen INCO und 16-2-LPS konnte elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Durch Vergleich des 16-2-LPS mit den LPS INCO-resistenter Mutanten wurde die rezeptoraktive Region des Phagen eingegrenzt. Acetyl- und Pyruvat-substituierte Zucker aus dem Kern-Oligosaccharid des 16-2-LPS sind wahrscheinlich für die Rezeptoraktivität verantwortlich.

II. Einleitung

Lipopolysaccharide (LPS) sind Komponenten der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Sie bestehen aus einem Lipidteil (Lipoid A), an den über ein Kern-Oligosaccharid (core) ein Polysaccharid (O-spezifische Seitenkette) aus sich wiederholenden Untereinheiten (repeating units) gebunden ist. Die Moleküle sind mit dem Lipoid A so in der Membran verankert, daß die Polysaccharidketten nach außen in das die Zelle umgebende Milieu weisen. Die exponierte Lage dieser Polysaccharidketten bestimmt die Funktionen des LPS als serologische Determinante der Zelle und als Phagenrezeptor.

Unsere heutige Kenntnis von Struktur und Funktion der LPS stützt sich vor allem auf Untersuchungen an Enterobacteriaceen-LPS (LÜDERITZ, 1970; WILKINSON, 1977). Über Rhizobien-LPS ist dagegen wenig bekannt.

Die Biochemie der Rhizobien-LPS wurde nur bei einigen Arten untersucht. Es existieren qualitative Analysen der Zuckerbestandteile bei mehreren Spezies (GRAHAM & O'BRIEN, 1968) sowie quantitative Analysen des Zuckergehalts bei R.trifolii (HUMPHREY & VINCENT, 1969; ZAJAC et al., 1975a,b) und bei R.leguminosarum (ZAJAC et al., 1975b; PLANQUE et al., 1979) und des Fettsäuregehalts bei R.japonicum (BUNN et al., 1970), R.trifolii (RUSSA & LORKIEWICZ, 1974) und R.leguminosarum (PLANQUE et al., 1979).

In seiner Funktion als Phagenrezeptor ist Rhizobien-LPS nur bei R.trifolii charakterisiert. Sowohl BARNET & VINCENT (1970) als auch ATKINS & HAYES (1972) konnten die Rezeptoraktivität für verschiedene Phagen dem LPS zuordnen. ZAJAC et al. (1975a) schließlich gelang die Lokalisierung des rezeptoraktiven Bereichs für den Phagen 1P im Polysaccharidanteil des R.trifolii-LPS.

In seiner Funktion als serologische Determinante hat Rhizobien-LPS in den letzten Jahren zunehmendes Interesse

gefunden. Der bei der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen zu beobachtende hohe Grad der Wirtsspezifität beruht wahrscheinlich auf einer spezifischen Wechselwirkung bakterieller und pflanzlicher Oberflächenantigene. Die LPS einiger Rhizobienarten scheinen an diesen Erkennungsmechanismen beteiligt zu sein: Durch die jeweiligen Wirtspflanzenlektine, deren Rolle als Bindungspartner der Rhizobien auf der Wurzelhaaroberfläche der Wirtspflanzen zur Zeit noch diskutiert wird (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974; DAZZO & BRILL, 1977), erfolgt speziesabhängig eine spezifische Agglutination entweder von Kapselantigenen (DAZZO & HUBBELL, 1975; DAZZO & BRILL, 1977; KAMBERGER, 1979a) oder von LPS der Bakterienstämme (WOLPERT & ALBERSHEIM, 1976; KAMBERGER, 1979a). PLANQUE & KIJNE (1977) schließlich schreiben die Lektinbindungsspezifität sowohl dem LPS als auch einem Mikrokapselsaccharid von R. leguminosarum zu.

Unabhängig davon konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß eine bestimmte chemische Zusammensetzung des R. japonicum-LPS (MAIER & BRILL, 1978) bzw. des R. leguminosarum-LPS (KAMBERGER, 1979b) essentiell für die Ausbildung der Symbiose ist.

Ob die Wirtsspezifität von R. lupini durch R. lupini-LPS mitbestimmt ist, weiß man nicht. Über eine mögliche Wechselwirkung von Lupinenlektinen mit R. lupini-LPS, die im Zusammenhang mit frühen Schritten der Symbiose stehen könnte, ist bisher nichts bekannt. Auch über die Biochemie des R. lupini-LPS existieren keine Veröffentlichungen.

Ziel der Arbeit war deshalb die biochemische Charakterisierung von R. lupini-LPS. Dazu war der Aufbau einer entsprechenden Methodik notwendig, mit deren Hilfe zunächst das LPS des aus Wurzelknöllchen von Süßlupinen isolierten Bakterienstammes 16-2 (LOTZ & MAYER, 1972) analysiert wurde. Mit den am 16-2-LPS erarbeiteten Methoden wurde dann das LPS des effektiv nodulierenden Stammes R. lupini D75 charakterisiert.

Für eine LPS-Analyse boten beide Stämme gute Voraussetzungen:

- (1) Das LPS des Stammes 16-2 ist Rezeptor für einen defekten Bakteriophagen (INCO), der vom nahe verwandten Stamm 16-3 produziert wird. Der INCO-Phage konnte als Selektionsmittel zur Isolierung von spezifisch in ihrem LPS veränderten Resistenzmutanten eingesetzt werden und war damit als Hilfsmittel zur Strukturaufklärung des 16-2-LPS geeignet.
- (2) Im Vergleich zu anderen R.lupini-Stämmen wächst der Stamm R.lupini D75 zu relativ hohen Dichten auf B+Y-Agarplatten an. Damit ist eine Gewähr für gute LPS-Ausbeuten gegeben.

Durch den Vergleich der LPS INCO-resistenter Mutanten wurde ein weiteres Ziel dieser Arbeit erreicht. Die Bestimmung der rezeptoraktiven Region des INCO-Phagen auf dem 16-2-LPS stellt einen Abschluß der an unserem Institut durchgeführten langjährigen Untersuchungen über phagenähnliche Bacteriocine von Bodenbakterien dar (LOTZ & MAYER, 1972; PFISTER & LOTZ, 1974; PFISTER & LODDERSTAEDT, 1977; PFISTER & BURKARDT, 1978).

III. Material und Methoden

1. Medien

NB : 8 g Nutrient Broth (Difco)
ad 1000 ml dest. Wasser

B+Y: Mannit 12,6 g
Difco Yeast Extract 2,7 g
Biotin 9 µg
Spurenelementelösung 0,9 ml
 $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 0,35 g
 KH_2PO_4 0,9 g
 KNO_3 0,495 g
 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,495 g
 $Ca(NO_3)_2 \cdot H_2O$ 1,17 g
ad 900 ml dest. Wasser

Für Festmedien wurde 15 g/l, für Weichagarmedien 6,5 g/l
Bacto Agar (Difco) zugesetzt.

2. Bakterienstämme

Die Bakterienstämme 16-2 und 16-3 wurden aus Wurzelknöllchen von Lupinen isoliert und vorläufig als Rhizobium bezeichnet (LOTZ & MAYER, 1972). Nodulationstests der beiden Stämme mit Lupinus luteus und Lupinus angustifolius verliefen jedoch negativ (LOTZ, VAN BRUSSEL, LODDERSTAEDT, alle unveröffentlicht). Der Stamm 16-2/I1 ist eine INCO-resistente (siehe III.4.) Spontanmutante des Stammes 16-2 (LOTZ & MAYER, 1972). Die Isolierung weiterer in dieser Arbeit benutzter INCO-resistenter Spontanmutanten ist unter 2.3.2.1. beschrieben. Stamm 16-3/IS2 ist eine Mutante des Stammes 16-3 mit einer 10fach höheren INCO-Produktion (PFISTER, 1973). Der Stamm Rhizobium lupini D75 (Bezugsquelle: CRIPP, CSSR) infiziert die Wurzeln von Lupinus angustifolius und bildet dort Wurzelknöllchen, deren C_2H_4 -Reduktionsrate 2 nMol/min mg Trockengewicht beträgt (NORDHOFF, persönliche Mitteilung).

Die Bakterienstämme 16-2 und 16-3 und die von ihnen abgeleiteten Mutantenstämme wurden auf NB-Festmedium, Stamm R.lupini D75 auf B+Y-Festmedium bei 4°C gehalten.

3. Bakteriophagen

Die virulenten Bakteriophagenstämme 16-2-1, 16-2-2, 16-2-3, 16-2-4 und 16-2-5 von Bakterienstamm 16-2 wurden von Dr. Lotz (Erlangen) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht erfolgte nach der Methode von EISENSTARK (1967). Die Phagensensitivität von Bakterienstämmen wurde durch einen Phagentropftest bestimmt. Dazu wurde die Phagensuspension (10^8 Plaque-bildende Einheiten/ml) auf einen durch Ausgießen der Bakterien (0,2 ml einer Suspension mit dem Titer 10^8 /ml) mit Weichagar (2,5 ml) gebildeten Bakterienrasen aufgetropft.

4. INCO-Isolierung und -Reinigung

Die Isolierung der INCO-Partikel ist bei LOTZ & MAYER (1972) beschrieben. Um eine höhere INCO-Ausbeute zu erhalten, wurde statt des Stammes 16-3 der Stamm 16-3/IS2 benutzt.

Die Reinigung des INCO-Lysats erfolgte durch Sucrosegradientenzentrifugation. Dazu wurden 29 ml eines linearen Sucrosegradienten (5-20 % (w/v) Sucrose in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0) mit 1 ml Rohlysate überschichtet und dann 4,5 Std. bei 25000 rpm in einem Swingout-Rotor (3 X 30 ml) einer WKF P50K-Ultrazentrifuge (WKF, Darmstadt) zentrifugiert. Die Abnahme des Gradienten erfolgte kontinuierlich vom Boden aus. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt, deren Sucrosekonzentration refraktometrisch bestimmt wurde. Die Transmission wurde mit einem Uvicord II-Photometer (LKB, Uppsala) gemessen.

Die gereinigten INCO-Lysate wurden bei 4°C über einem Tropfen Chloroform aufbewahrt. Die bakterizide Aktivität der Lysate wurde durch Endpunktsverdünnung nach OZENKI (1968) mit Hilfe des sensitiven Indikatorstammes 16-2 bestimmt.

5. Isolierung und Reinigung von LPS

Zur LPS-Isolierung wurden die Bakterienstämme bis zur frühen stationären Phase angezogen. Die Kultivierung des Stammes 16-2 und seiner Derivate erfolgte in 5 l-Steilbrustflaschen unter kräftiger Belüftung bei 30°C im Wasserbad. Nach 2 Tagen wurden die Zellen durch niedrigtourige Zentrifugation (10000 rpm, 15 min) abgeerntet und 3X mit Puffer Saline gewaschen. Die Massenkultivierung des Stammes R.lupini D75 erfolgte auf B+Y-Festmedium (Inoculum pro Platte: 1,5 ml einer Bakteriensuspension mit der $OD_{650} = 0,1$). Die Platten wurden 5 - 7 Tage bei 30°C bebrütet und dann mit dest. Wasser abgeschwemmt. Zur Entfernung des EPS wurden die so erhaltenen Zellen anschließend 10X mit Puffer Saline gewaschen. Die LPS-Isolierung aus den Bakterienzellen erfolgte mit heißem Phenol/Wasser nach WESTPHAL & JANN (1965), die Reinigung durch Dialyse der wässrigen Phase gegen dest. Wasser (4°C, 5 X 5 l) und durch wiederholte hochoctourige Zentrifugation (2 Std., 100000 X g). Die Abwesenheit von Nukleinsäure- und Proteinverunreinigungen in der LPS-Präparation wurde durch UV-Adsorptionspektroskopie und durch Dünnschicht- und Gaschromatographie (Abwesenheit von Ribose) überprüft.

6. Test auf Rezeptoraktivität

Zur Prüfung der Rezeptoraktivität wurden INCO-Partikel mit LPS oder LPS-Bestandteilen in Puffer Saline (30 min, 30°C) inkubiert. Als Rezeptoraktivität des LPS wurde der Quotient aus dem INCO-Titer einer unbehandelten Kontrolle und dem INCO-Titer einer mit LPS inkubierten INCO-Suspension bezeichnet.

7. Modifikation der LPS-Struktur mit spezifisch wirkenden Agentien

Zur Oxydation mit Perjodat wurden 0,4 mg LPS in 0,3 ml 0,2 M Natriumacetat mit 0,1 ml 0,2 M Perjodsäure versetzt. Nach 5 Std. bei RT erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 0,12 ml Athylenglykol.

Zur Hydrazinolyse wurde 1 mg LPS mit 1 ml wasserfreiem Hydrazin (Roth, Karlsruhe) im verschlossenen Röhrchen 16 Std. bei 100°C behandelt. Nach Abdampfen des überschüssigen Hydrazins am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mit wenig Wasser versetzt und zur Entfernung der unlöslichen Fettsäurehydrazide 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert.

Durch milde Hydrolyse mit Säure und Alkali wurde das LPS in Lipoid A und Polysaccharid gespalten. Je 1 mg LPS wurde dazu mit 1 % (w/v) Essigsäure (2 Std., 100°C) bzw. 0,1 N Ba(OH)₂ (RT, über Nacht) behandelt. Die wasser-unlösliche Lipoid A-Fraktion wurde durch Zentrifugation (10 min, 10000 rpm) entfernt.

Die durch die beschriebenen Reaktionen erhaltenen Produkte wurden durch Dialyse (4°C, 5 X 0,5 l dest. Wasser) von niedermolekularen Bestandteilen befreit, lyophilisiert und für Tests auf Rezeptoraktivität in äquivalenten Mengen (0,1 mg) in 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, gelöst.

Zur Bestimmung der Rezeptoraktivität DOC-behandelten LPS wurde 0,1 mg LPS vor der Inkubation mit INCO-Partikeln in 0,9 ml 1 % (w/v) DOC in 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, gelöst.

8. Analytische Methoden

8.1. Quantitative Farbreaktionen

Phenol-Schwefelsäure-Test (DUPOIS et al., 1955)

Reagentien: I 5 % (w/v) Phenol

II cc. H_2SO_4

0,5 ml wässrige Zuckerlösung wurden mit 0,5 ml Reagenz I versetzt und gut durchmischt. Nach Zugabe von 2,5 ml Reagenz II durch direktes Auftropfen auf die Flüssigkeitsoberfläche wurde die Farbe 10 min bei RT und 20 min bei 30°C im Wasserbad entwickelt. Die Messung der Adsorption erfolgte bei 485 nm. Als Standardsubstanz zur Erstellung einer Eichgeraden wurde Glucose (10 - 100 µg) verwendet.

KDO-Bestimmung

Die Bestimmung von KDO erfolgte nach der Thiobarbitursäuremethode von WARAVDEKAR & SASLAW (1959) mit den bei OSBORN et al. (1972) beschriebenen Modifikationen.

Reagentien: I 0,25 N H_2SO_4

II 0,1 N HJO_4

III 4 % (w/v) Natriumarsenit in 0,5 N HCl

IV 0,6 % (w/v) Thiobarbitursäure

V Butanol/cc.HCl (95:5)

LPS-Proben mit 0,01 - 0,05 µM KDO wurden in 100 µl Reagenz I hydrolysiert (8 min, 100°C) und nach Abkühlen auf RT mit 50 µl Reagenz II oxydiert (10 min, 55°C). Nach Zugabe von 200 µl Reagenz III und 800 µl Reagenz IV wurde die Lösung 10 min auf 100°C erhitzt. Der gebildete Farbstoff wurde unter Eiskühlung mit Reagenz V extrahiert und seine Extinktion bei 532 nm gemessen. Eine Eichgerade wurde mit 0,01 - 0,05 µM KDO (Sigma) hergestellt.

Hexosamin-Bestimmung (STRÖMINGER et al., 1959)

- Reagentien I gesättigte, wässrige Lösung von NaHCO_3
II 5 % (v/v) Acetanhydrid in Wasser (stets frisch)
III 5 % (w/v) $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$
IV DMAB-Lösung

Stammlösung: 16 g p-Dimethylaminobenzaldehyd
in Eisessig/cc.HCl (95:5) bei
4°C aufbewahren.

Bestimmung: Für die Bestimmung 1 Teil Stamm-
lösung und 2,5 Teile Eisessig
mischen.

1 - 2 mg LPS wurden in 100 μl 4 N HCl 1 Std. bei 100°C hydro-
lysiert. Je 5 μl und 10 μl wurden dem Hydrolysat entnommen
und im Exsiccator zur Trockne eingeengt. Nach dem Lösen des
Rückstandes in 40 μl dest.wasser unter Eiskühlung erfolgt
die Bildung von N-Acetylhexosamin durch Zugabe von 10 μl
Reagenz I und 10 μl Reagenz II nach 10 min bei RT und 3 min
bei 100°C. Nun wurden 50 μl Reagenz III zugegeben und 7 min
auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT und Zugabe von 700 μl
Reagenz IV wurde die Farbe 20 min bei 37°C entwickelt und bei
585 nm photometriert. Als Eichstandard diente Glucosamin-HCl
(Serva).

Rhamnose-Bestimmung (DISCHE & SHETTLES, 1948)

- Reagentien I $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (6:1)
II 3 % (w/v) Cystein-HCl (Serva)

0,1 mg LPS oder PS wurden in 1 ml dest.Wasser gelöst und
unter Eiskühlung mit 4,5 ml Reagenz I versetzt. Nach 10minü-
tigem Erhitzen auf 100°C wurden die Proben auf RT abgekühlt
und zur Bildung des Farbstoffs mit 0,1 ml Reagenz II ver-
setzt. Die Farbe wurde während 4 Std. bei RT im Dunkeln ent-
wickelt und bei 400 nm und 430 nm gemessen. Die Differenz
der beiden Extinktionswerte ($E_{400} - E_{430}$) wurde mit den
Werten einer auf dieselbe Weise erhaltenen Eichgeraden mit
12 - 36 μg Rhamnose verglichen.

Phosphat-Bestimmung (LOWRY et al., 1954)

Reagentien I Aufschlußreagenz: 30 ml cc. H_2SO_4 und 30 ml
60 %ige Perchlorsäure mit
dest.wasser auf 100 ml
II Farbreagenz: 1 ml 1 M Natriumacetat
1 ml 2,5 % (w/v) Ammoniummolybdat
1 ml 10 % (w/v) Ascorbinsäure
7 ml dest.Wasser

Die Proben wurden in 0,1 ml Reagenz I gelöst und 1 Std. bei 95 - 98°C und 2 Std. bei 165±1°C im Trockenschrank aufgeschlossen. Nach Abkühlen wurde unter Eiskühlung 1 ml reagenz II hinzugefügt und sofort durchmischt. Die Farbe wurde 90min im Wasserbad bei 38°C entwickelt und anschließend die Extinktion bei 820 nm gemessen. Als Eichsubstanz diente eine Lösung von 0,01 M KH_2PO_4 (1 - 5 μ l).

Acetylgruppenbestimmung (HESTRIN, 1949)

Reagentien I 2 M Hydroxylamin-HCl
II 3,5 N NaOH
III cc.HCl/ H_2O (1:2)
IV 0,37 M $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ in 0,1 N HCl
V 0,001 N Natriumacetat pH 4,5

1 ml Probe mit ca. 10 mg LPS in Lösung V wurde mit 2 ml alkalischer Hydroxylaminlösung (1 ml I + 1 ml II) versetzt und mindestens 1 min bei RT stehengelassen. Die Farbe wurde durch Zugabe von 1 ml Reagenz III und 1 ml Reagenz IV entwickelt und bei 540 nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit 1 - 5 μ M Acetylcholinchlorid hergestellt.

Pyruvatgruppenbestimmung (SLONEKER & ORENTAS, 1962)

Reagentien I 1 N HCl
II 0,5 % (w/v) Dinitrophenylhydrazin in 2 N HCl
III Äthylacetat
IV 10 % (w/v) Natriumcarbonat

Die Proben mit 0,2 - 0,4 % (w/v) LPS oder PS wurden 3 Std.

in Reagenz I hydrolysiert. 2 ml davon wurden mit 1 ml Reagenz II versetzt. Nach 5 min wurde das Gemisch mit 5 ml Reagenz III extrahiert. Nach dreimaliger Extraktion der Athylacetatphase mit je 5 ml Reagenz IV wurden die vereinigten Natriumcarbonatphasen mit Reagenz IV auf 25 ml aufgefüllt und bei 375 nm gemessen. Die Eichung erfolgte mit 0,2 - 1,0 μ M Brenztraubensäure.

8.2. Dünnschichtchromatographie

Hydrolyse

Die LPS- oder PS-Probe wurde mit 1 ml 1 N H_2SO_4 in einem Hydrolyseröhrchen 4 Std. bei $100^\circ C$ hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit mit 1 N $Ba(OH)_2$ neutralisiert und das ausfallende $BaSO_4$ abzentrifugiert (15 min, 10000 rpm); der Überstand wurde lyophilisiert und für die Dünnschichtchromatographie mit so viel Lösungsmittel versetzt, daß eine 2 %ige Lösung entstand.

Chromatographie

Die Auftrennung der Zuckerkomponenten aus den Proben erfolgte auf DC-Alufolien Cellulose, 20 X 20 cm (Merck, Darmstadt). Laufmittel war ein Gemisch aus Essigsäure (1), Essigsäureäthylester (7), Pyridin (5) und Wasser (3) (PREHM, 1974) bzw. aus Pyridin (4), Butanol (6) und Wasser (3). Nach dem Lauf wurden die Chromatogramme mit Heißluft getrocknet und im Trockenschrank (15 min, $100^\circ C$) vom Laufmittel befreit.

Nachweis der Zucker

Der Nachweis der Zucker erfolgte durch Anfärbung mit Anilinththalat (PARTRIDGE, 1969). Dazu wurden 1,66 g Phthalsäure und 0,9 ml Anilin in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst. Die Chromatogramme wurden mit dem Reagenz besprüht und bis zum Auftreten einer Färbung bei $100^\circ C$ im Trockenschrank gehalten. Zur Identifizierung der Zucker dienten parallel laufende Standards.

8.3. Gaschromatographie

Gaschromatographische Analysen von Zuckern und Fettsäuren wurden mit einem Hewlett Packard 5730 A-Gerät, ausgerüstet mit Flammenionisationsdetektor und Integrator Hewlett Packard 3380 A, durchgeführt.

Gaschromatographische Fettsäurebestimmung (METCALFE & SCHMITZ, 1961)

Ca. 1 mg LPS wurde vor der Hydrolyse mit einer geeigneten Menge Margarinsäure (17:0) in Benzol als internem Standard versetzt. Nach Abdampfen des Benzols im Vacuumexsiccator wurden die Proben mit 6 N HCl 6 Std. bei 100°C hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren wurden 4 - 5X mit je 400 μ l Petroläther (40 - 60°C) extrahiert, im Vacuumexsiccator getrocknet und dann zur Methylierung 2 min bei 100°C mit 0,5 ml Methanol/BF₃ (Serva) behandelt. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit 0,3 ml dest. Wasser versetzt und 3X mit je 400 μ l Petroläther (40 - 60°C) extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden im Exsiccator getrocknet, die zurückbleibenden Methylester in Chloroform gelöst und in den Gaschromatographen eingespritzt. Das Gerät war mit einer Stahlsäule (Länge 150 cm, Durchmesser 1/8 Zoll) ausgerüstet, in der sich als Trennflüssigkeit 15 % EGSS-X auf Gaschrom P (100/200 mesh, Applied Science) befand. Die Temperatur betrug 175°C bzw. 185°C. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Durchflußrate von 30 ml/min.

Gaschromatographische Zuckerbestimmung (SAWARDEKER et al., 1965)

Ca. 5 mg LPS oder PS wurden mit einer geeigneten Menge Xylose als internem Standard versetzt und mit 0,1 N HCl 48 Std. bei 100°C hydrolysiert. Nach Abkühlen wurden die Proben auf etwa das Fünffache verdünnt und mit Ionenaustauscher IRA 410, HCO₃⁻-Form (Serva), neutralisiert. Die Lösung wurde nun filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Wasser gelöst und zur Reduktion der Monosaccharide mit 0,5 ml NaBH₄ (4 mg/ml) versetzt (5 Std.,

RT, im Dunkeln). Natriumionen wurden aus der Probe durch Ionenaustauscher Dowex 50, H^+ -Form (Serva), überschüssige Borsäure durch fünfmaliges Versetzen mit 1,5 ml Methanol und Einengen am Rotationsverdampfer entfernt. Die Acetylierung der so erhaltenen Alditole erfolgte durch 15minütiges Erhitzen der Probe mit 0,5 ml Pyridin/Essigsäureanhydrid (1:1) auf $100^{\circ}C$. Die Probe wurde nun solange mit Wasser versetzt und am Rotationsverdampfer eingeengt, bis Pyridin und Essigsäureanhydrid restlos vertrieben waren. Chloroformlösungen der so erhaltenen Alditolacetate wurden in den Gaschromatographen eingespritzt, der mit einer Stahlsäule (Länge 150 cm, Durchmesser 1/8 Zoll) mit 3 % ECNSS-X auf Gaschrom Q (100/120 mesh; Applied Science) als Trennflüssigkeit versehen war. Die Säulentemperatur betrug $140^{\circ}C$, $165^{\circ}C$ oder $185^{\circ}C$. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Durchflusgeschwindigkeit von 30 ml/min.

8.4. Gelchromatographische Molekulargewichtsbestimmung

Isolierung der Zuckerketten

Die Zuckerketten des LPS wurden durch milde Hydrolyse mit 1 % (v/v) Essigsäure (2Std., $100^{\circ}C$) vom Lipoid A abgetrennt. Das ausgeflockte Lipoid A wurde abzentrifugiert und der die Saccharide enthaltende Überstand lyophilisiert.

Chromatographie

Die Chromatographie der Zuckerketten erfolgte an einer mit Dextranen geeichten Sephadex G50-Säule ($V_0 = 31$ ml, $V_0 + V_i = 74$ ml, siehe PFISTER & LODDERSTAEDT, 1977; im Fall des D75-OS siehe unter IV.1.2.4.1.) mit Pyridin-Acetat-Puffer (Pyridin : Eisessig : Wasser = 10 : 4 : 986) und einer Elutionsgeschwindigkeit von 3,2 ml/Std.. Der Nachweis der Zucker in den einzelnen Fraktionen erfolgte mit Phenol-Schwefelsäure (DUBOIS et al., 1955). Die Zucker enthaltenden Gipfelfraktionen wurden vereinigt und für weitere Analysen lyophilisiert.

8.5. SDS-Gelelektrophorese

Anfärbung der LPS

Die Färbung von LPS durch Procion-Farbstoffe ist bei JANN et al. (1975) beschrieben. Für die Anfärbung des 16-2-LPS wurde Procion Rubine MX 2B (ICI Chemicals, Geschenk der Firma Erba AG, Erlangen) benutzt.

Elektrophoretische Auftrennung

Die Elektrophoresen wurden in einem 5 %igen Polyacrylamid-Gelsystem nach SHAPIRO et al. (1967) durchgeführt, das 1 % SDS enthielt. Die mit Procion gefärbten LPS wurden zu 1 mg/ml in Desintegrationspuffer (1 ml 1 M Phosphatpuffer pH 7,1, 1 ml 10 % (w/v) SDS, 1 ml 10 % (v/v) Mercaptoäthanol, 2 g Harnstoff ad 5 ml dest. Wasser) gelöst. 100 µl dieser Mischung (100 µg LPS) wurden pro Gel aufgetragen und 4 Std. bei 6 V/cm aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente 0,05 M Phosphatpuffer mit 1 % SDS.

9. Serologische Methoden

Herstellung von Antiseren

Antisera gegen LPS wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den entsprechenden Bakterienzellen präpariert. Dazu wurden Übernachtskulturen der Bakterien in Puffer Saline gewaschen, 2 Std. bei 100°C erhitzt und noch einmal in Puffer Saline gewaschen (3 X, 10 min, 10000 rpm).

Eine Suspension der Bakterien in Puffer Saline mit der $OD_{620} = 2,0$ wurde dann in zweitägigen Intervallen in die Ohrvene der Kaninchen eingespritzt (1.Tag: 0,1 ml; 4.Tag: 0,2 ml; 7.Tag: 0,4 ml; 10.Tag: 0,8 ml). Die Entblutung der Kaninchen erfolgte am 16.Tag nach der ersten Injektion. Das Serum wurde am gleichen Tag vom Blutkuchen getrennt, nach 24 Std. bei 4°C noch einmal zentrifugiert und im Gefrierschrank bei -15 bis -20°C aufbewahrt.

Hämagglutinationshemmtest

Hämagglutinationshemmtests wurden unter Verwendung von menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe 0 durchgeführt. Die Affinität des 16-2-LPS gegenüber den Erythrozyten wurde dabei vor der Beladung durch eine Alkalibehandlung des LPS erhöht (NETER, 1956). Dazu wurden 50 mg 16-2-LPS in 5 ml 0,25 N NaOH gelöst und 1 Std. auf 56°C erwärmt. Nach Abzentrifugieren des entstehenden Niederschlags wurde die Lösung durch Zutropfen von Eisessig neutralisiert, 24 Std. gegen dest.wasser dialysiert und lyophilisiert. Parallel dazu wurde eine Erythrozytensuspension zentrifugiert und das Sediment 3 X mit 0,85 % NaCl gewaschen. 0,05 ml des Sediments wurden mit 5 ml 0,85 % NaCl gemischt, mit 0,1 ml einer Lösung von alkalibehandeltem 16-2-LPS (1 mg/ml) in 0,85 % NaCl versetzt und 1 Std. bei 37°C im Brutschrank gehalten. Anschließend wurde 3 X mit Puffer Saline gewaschen und das Sediment in 5 ml Puffer Saline suspendiert (Erythrozytensuspension).

Als Hemmstoff wurden ganze Zellen des Bakterienstammes 16-2 und seiner Mutanten verwendet. Zellen aus Übernachtskulturen der Stämme wurden Puffer Saline gewaschen, 2 Std. bei 100°C gekocht, 3 X mit Puffer Saline und 3 X mit Aceton gewaschen und dann lyophilisiert. Ausgang für die Verdünnungsreihen des Hemmtests waren Zellsuspensionen mit je 30 mg Trockengewicht/ml (Hemmstoffsuspension).

In einer Verdünnungsreihe (1/2, 1/4, 1/8,) wurden die Hemmstoffsuspensionen der einzelnen Stämme mit Puffer Saline verdünnt. Zu je 50 ul jeder Hemmstoff-Verdünnung wurden nun je 50 ul 16-2-Antiserum gegeben. Nach 1stündiger Inkubation bei 37°C wurden 100 ul Erythrozytensuspension zugesetzt und die Röhrchen noch einmal 1Std. bei 37°C inkubiert. Nach 24 Std. bei 4°C wurde der Titer mikroskopisch abgelesen.

Ouchterlony-Immundiffusion

Die Gele wurden aus 0,7 % Agarose A (Pharmacia) in PBS-Puffer (0,14 M NaCl, 0,001 M MgSO_4 , 0,05 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2) mit 1 mg/ml Thimerosal hergestellt. Die Löcher waren 3 mm tief, hatten 6 mm Durchmesser und waren 4 mm voneinander entfernt. Die Löcher wurden mit einer 0,5 %igen Lösung der LPS im oben beschriebenen PBS-Puffer gefüllt (je 50 μl). Das zentrale Loch wurde mit 50 μl 16-2-Antiserum gefüllt. Nach 48 Std. bei RT waren die Präzipitationsbanden sichtbar.

10. Elektronenmikroskopie

Alle Präparationen wurden auf Kohle-beschichteten Kupfer-netzen ausgeführt. Die Kontrastierung erfolgte nach VALENTINE et al. (1968) mit 2 % Uranylacetat, pH 4,8. Mit Ausnahme des D75-LPS (Philips EM 400) wurden alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem Jeol JEM 7A-Gerät gemacht.

IV. Ergebnisse

1. Die LPS der aus Lupinenknöllchen isolierten Bakterienstämme 16-2 und R.lupini D75

1.1. Das 16-2-LPS

1.1.1. Isolierung und Reinigung

16-2-LPS wurde nach der Methode von WESTPHAL & JANN (1965) mit heißem Phenol/Wasser isoliert und mittels mehrmaliger hochtouriger Zentrifugation solange gereinigt, bis das UV-Spektrum der wässrigen Phase keine Gipfel bei 280 nm (Proteine) und 256 nm (Nukleinsäuren) aufwies. Elektronenmikroskopisch zeigen LPS eine stamm-spezifische Morphologie. In der 16-2-LPS-Präparation sind neben kugeligen Strukturen vor allem bandförmige, verzweigte Strukturen zu erkennen (Abb. 1).

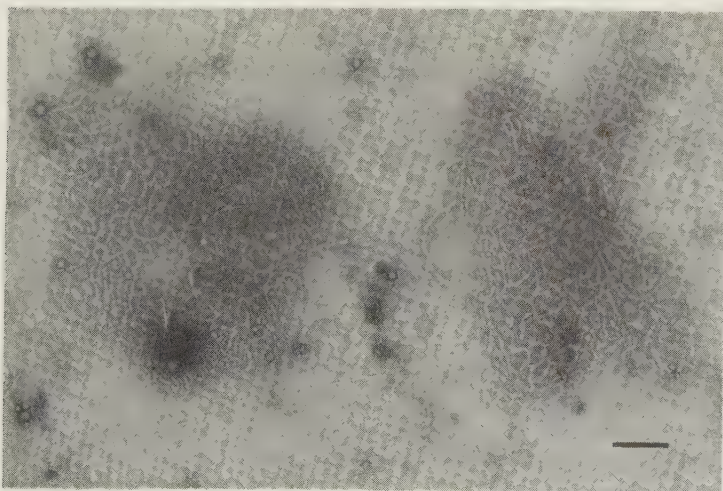


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung des 16-2-LPS (0,5 mg/ml). Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Längenangabe: 200 nm.

1.1.2. Gaschromatographische Bestimmung des Fettsäuregehalts

Nach Hydrolyse des LPS wurden die Fettsäuren gaschromatographisch als Methylester bestimmt. Hydroxymyristinsäure (3-OH 14:0) Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), und eine Hexadecensäure (16:1) im molaren Verhältnis 4 : 1 : 1 : 1 bilden den Hauptanteil der im Lipoid A enthaltenen Fettsäuren. Ihr Gewichtsanteil am 16-2-LPS wurde mit Margarinsäure (17:0) als internem Standard bestimmt und ist in Tab. 2 verzeichnet.

Fettsäurebestandteil	Gewichtsprozent
Hydroxymyristinsäure	4,3
Myristinsäure	1,6
Palmitinsäure	0,6
Hexadecensäure	0,9

Tab. 2: Fettsäurebestandteile des 16-2-LPS. Erläuterungen im Text.

1.1.3. Zucker- und Phosphatgehalt

Qualitative Analysen des 16-2-LPS wurden bereits von Pfister (PFISTER & LODDERSTAEDT, 1977) durchgeführt. Wie durch Hochspannungselektrophorese gegen Standardsubstanzen nachgewiesen wurde, enthält das LPS KDO und Glucosamin als einzige geladene Komponenten. Als Neutralzucker konnte dünnschichtchromatographisch nur Rhamnose nachgewiesen werden.

Die quantitative Zusammensetzung des 16-2-LPS wurde mit Hilfe spezifischer Farbtests ermittelt. Der durch Phenol-

Schwefelsäure bestimmte Zuckergehalt der LPS-Präparation betrug 65 %. Mit 37 % stellt Rhamnose die Hauptkomponente des 16-2-LPS dar. Außerdem enthält das LPS 5,9 % Glucosamin, 0,8 % KDO und 2,0 % Phosphat. Die Ergebnisse der Farbttests sind in Tab. 1 verzeichnet.

Komponente	Gewichtsprozent
Rhamnose	37,0
Glucosamin	5,9
KDO	0,8
Phosphat	2,0

Tab. 1: Zucker-und Phosphatgehalt des 16-2-LPS. Die Bestimmung erfolgte aufgrund spezifischer Farbttests (siehe Material und Methoden).

Die Neutralzucker des 16-2-LPS wurden zusätzlich gaschromatographisch bestimmt. Dazu wurden die durch Hydrolyse des 16-2-LPS erhaltenen Monosaccharide in die Alditolacetate übergeführt und bei 165°C bzw. 185°C auf einer mit 3 % ECNSS-M als flüssiger Phase beladenen Säule aufgetrennt. Wie aus den Chromatogrammen hervorgeht, ist Rhamnose der Hauptbestandteil des 16-2-LPS. Durch Vergleich mit Xylose als internem Standard wurde eine Rhamnosegehalt von 40 % ermittelt (Abb. 2).

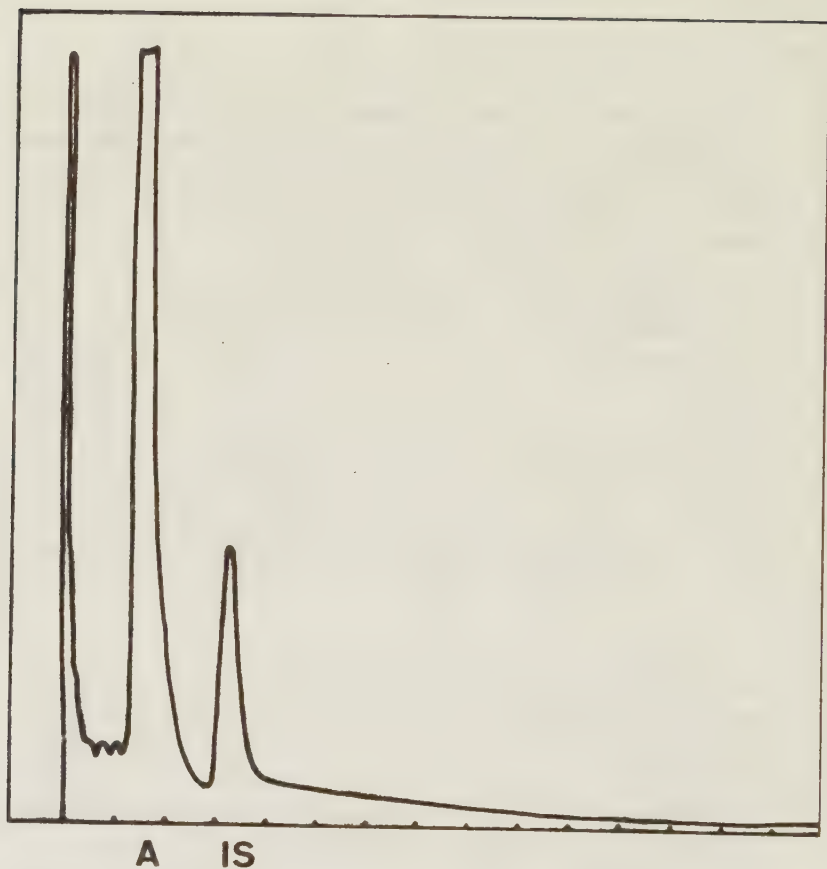


Abb. 2: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus dem 16-2-LPS.
Säulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.
A = Rhamnose, IS = Xylose als interner Standard.

1.1.4. Untersuchung der Polysaccharid-Seitenkette

Zur Lokalisierung der Einzelbestandteile der PS-Seitenkette wurde diese durch einstündige Hydrolyse mit 1 % Essigsäure ("milde Hydrolyse") vom Lipoid A abgetrennt und gesondert untersucht. Bei dieser Behandlung werden die KDO-Bindungen des LPS-Moleküls gespalten; die glykosidischen Bindungen der Zucker bleiben intakt. Nach Abzentrifugieren des unlöslichen Lipoid A erhält man das lösliche PS durch Lyophilisieren des Überstands.

1.1.4.1. Gelchromatographische Reinigung und Bestimmung des Molekulargewichts

Bei der gelchromatographischen Reinigung der PS-Fraktion an einer Sephadex G50-Säule wurde die Zuckerpräparation in zwei Fraktionen aufgetrennt (Abb. 3).

Da die Chromatographie an einer geeichten Säule durchgeführt wurde, konnte das Molekulargewicht der beiden Saccharidfraktionen aus ihrem Elutionsvolumen bestimmt werden. 16-2-LPS enthält demnach ein Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von etwa 8000 D und ein Oligosaccharid mit einem Molekulargewicht von ca. 900 D. Die Oligosaccharide stellen wahrscheinlich die core-Region des LPS dar und entstehen bei der Hydrolyse solcher LPS-Einheiten, die keine O-spezifischen Seitenketten tragen (WILKINSON, 1977).

Die Heterogenität des 16-2-LPS konnte auch auf andere Weise nachgewiesen werden: In Gegenwart von SDS ist eine gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener LPS-Moleküle möglich. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist dabei vom prozentualen Anteil des Lipoid A-Teils am LPS, und damit auch von der Länge der PS-Seitenketten des LPS, abhängig. Durch vorherige An-

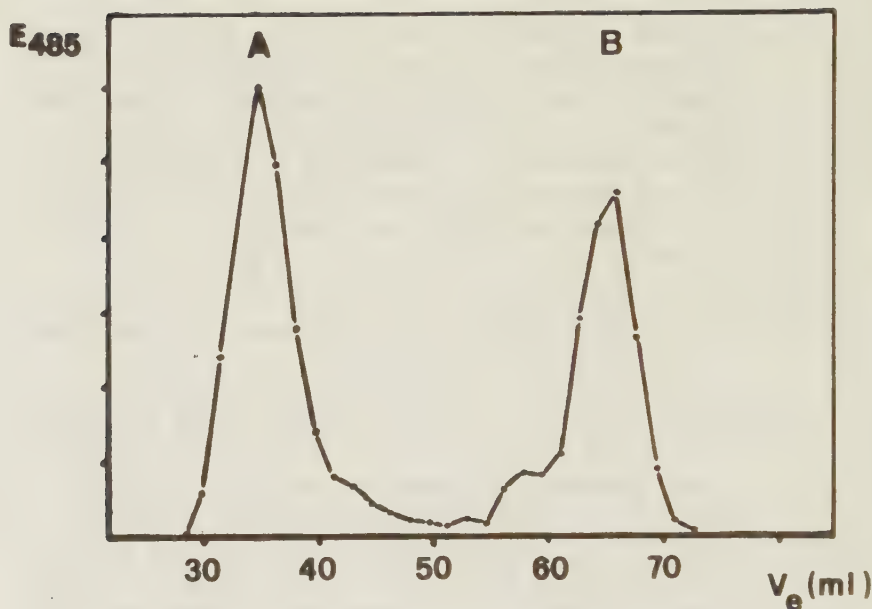


Abb. 3: Reinigung der Zuckeranteile von 16-2-LPS an einer Sephadex G50-Säule. Der relative Zuckergehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch das Phenol-Schwefelsäure-Reagenz (DUBOIS et al., 1955) bestimmt und als Extinktion bei 485 nm gegen das Elutionsvolumen V_e aufgetragen. Säulenparameter siehe Material und Methoden.

A = Polysaccharid des 16-2-LPS.

B = Oligosaccharid des 16-2-LPS.

färbung der PS-Ketten mit Procion-Farbstoff kann die während der Elektrophorese erfolgende Wanderung der verschiedenen Banden im Gel direkt beobachtet werden

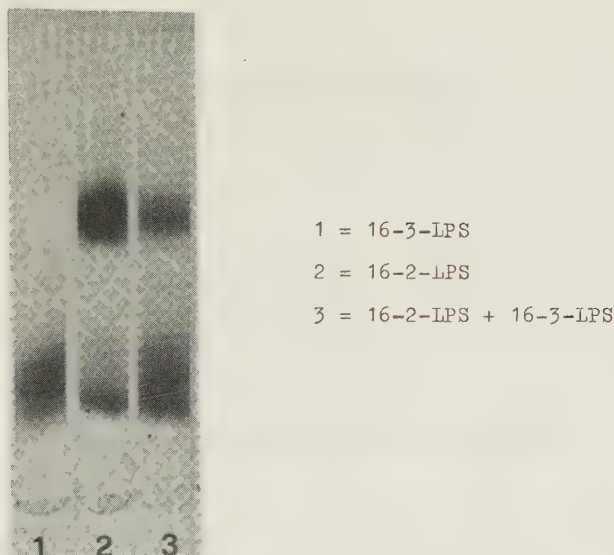


Abb. 4: SDS-Gelelektrophorese von 16-2-LPS. Die Färbung des LPS mit Procion Rubine erfolgte nach JANN et al. (1975). Als Vergleichs-LPS diente 16-3-LPS, dessen PS-Seitenkette ein Molekulargewicht von 1400 D hat (PFISTER, 1975). Elektrophoresebedingungen siehe Material und Methoden.

(JANN et al., 1975). Das mit Procion Rubine gefärbte 16-2-LPS wird durch SDS-Gelelektrophorese in zwei Banden aufgetrennt und besteht deshalb aus zwei Arten von LPS-Molekülen (Abb. 4). Die LPS-Präparation ist nicht durch Polysaccharide verunreinigt. Da Procion-Farbstoffe unspezifisch an die Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten binden, reine Polysaccharide unter den beschriebenen Bedingungen aber nur wenig in das Gel einwandern (LODDERSTÄDT, unveröffentlicht), wären solche Verunreinigungen an einer Bande am oberen Rand der Gele erkennbar.

1.1.4.2. Zusammensetzung des Polysaccharids

Der Rhamnose-, Glucosamin- und Phosphatgehalt des PS wurde durch spezifische Farbttests ermittelt. Die 8000 D-Zuckerkernte des 16-2-LPS enthält 72 % Rhamnose, 2,3 % Glucosamin und 0,9 % Phosphat. KDO war nur in Spuren nachweisbar.

Die gaschromatographische Bestimmung der Neutralzucker des 8000 D-Polymers ergab keine neuen Gesichtspunkte. wie auf den Chromatogrammen des Gesamt-LPS war auch hier nur ein dominierender Rhamnose-Gipfel erkennbar (Abb. 5).

1.1.4.3. Zusammensetzung des Kern-Oligosaccharids

Die Fraktion des 900 D-Oligosaccharids enthielt 2 % Rhamnose, 0,7 % Glucosamin und 5,9 % Phosphat. Gegenüber dem 8000 D-Polymer war KDO um den Faktor drei angereichert. Die für Rhamnose und Glucosamin ermittelten Werte sind so niedrig, daß es sich dabei vermutlich um Verunreinigungen durch das PS handelt.

Die gaschromatographische Analyse der Neutralzucker des OS ergab drei prominente Gipfel, deren Retentionszeiten den Zuckern Heptose, Glucose und Mannose entsprachen (Abb. 6). Aus dem Flächenverhältnis Heptose (1) : Glucose (1,73) : Mannose (2,48) errechnet sich ein molares Verhältnis dieser Komponenten von Heptose (1) : Glucose (2) : Mannose (3). Aus der Summe der Molekulargewichte von 1 Heptose-, 2 Glucose- und 3 Mannosemolekülen ergibt sich schließlich ein Molekulargewicht des OS von ca. 1000 D, das in guter Ubereinstimmung mit dem säulenchromatographisch bestimmten Molekulargewicht von 900 D steht.

Diese Zuckerkomponenten des Kern-OS sind auch bei der gaschromatographischen Analyse des 16-2-LPS und des



Abb. 5: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus 16-2-PS.
Säulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.
A = Rhamnose, IS = Xylose als interner Standard.

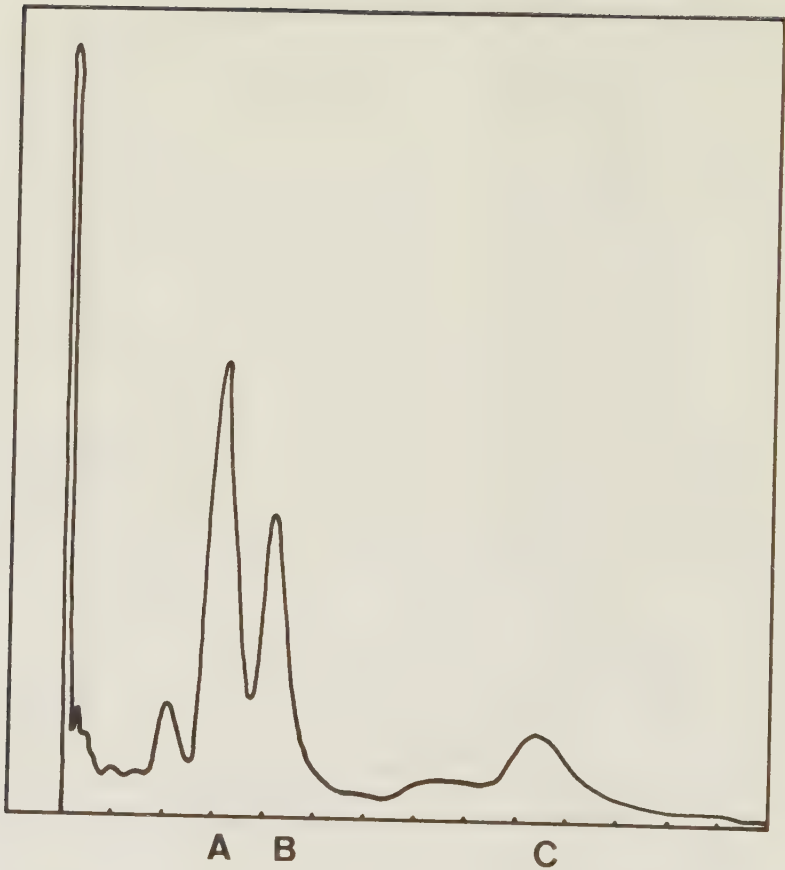


Abb. 6: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus dem 16-2-OS.
Säulentemperatur: 185°C isotherm. Einheit: 2 min.
A = Mannose, B = Glucose, C = Heptose.

16-2-PS nachweisbar. Beim Einspritzen höherer Probenkonzentrationen in die Säule traten an der auslaufenden Flanke des Rhamnosegipfels drei weitere Gipfel auf, deren Retentionszeiten etwa denen der als core-Bestandteile identifizierten Zucker entsprachen. Die Gesamtfläche dieser Gipfel macht 7,5 % der Fläche des Rhamnosegipfels aus.

1.1.4.4. Aufbau der Zuckerkette

Die Zuckerkette des 16-2-LPS ist ein PS mit einem Molekulargewicht von 8000 D, das aus einem Kern-OS mit dem Molekulargewicht 900 D und einer O-spezifischen Seitenkette zusammengesetzt ist.

Der prozentuale Anteil und die molaren Verhältnisse der durch Farbttests bestimmten Komponenten des 16-2-PS und des 16-2-OS sind in Tab. 3 gegenübergestellt.

Komponente	Polysaccharid		Oligosaccharid	
	Gew. %	mV	Gew. %	mV
Rhamnose	72,0	48,9	2,0	0,19
Glucosamin	2,3	1,4	0,7	0,06
KDO	0,5	0,2	1,6	0,10
Phosphat	0,9	1,0	5,9	1,00

Tab. 3: Prozentualer Anteil und molare Verhältnisse der durch Farbttests bestimmten Komponenten des 16-2-PS und des 16-2-OS. Bestimmungen: siehe Methoden; mV = molares Verhältnis auf $\text{PO}_4 = 1,0$ bezogen.

Nach den vorliegenden Daten enthält das 16-2-PS neben 1 Glucosaminmolekül 49 Rhamnoseuntereinheiten. Die im PS enthaltene Phosphatgruppe ist auch als OS-Bestandteil

nachweisbar und damit im 16-2-OS lokalisiert. Eine eindeutige Zuordnung des im PS nachgewiesenen Glucosaminmoleküls zum OS ist dagegen nicht möglich. KDO ist sowohl in der PS- als auch in der OS-Fraktion vorhanden. Die neben Rhamnose im PS vorliegenden Neutralzucker Heptose, Glucose und Mannose sind core-Bestandteile, deren quantitative gaschromatographische Bestimmung ein molares Verhältnis von Heptose (1) : Glucose (2) : Mannose (3) ergab. Aus der Summe der Molekulargewichte der core-Bestandteile Heptose (1), Glucose (2), Mannose (3) und Phosphat (1) ergibt sich rechnerisch ein core-Molekulargewicht von ca. 1100 D; das Molekulargewicht des anschließenden Rhamnosepolymers aus 49 Untereinheiten läßt sich zu etwa 7100 D errechnen. Die Summe der beiden Werte ergibt für das gesamte 16-2-PS ein Molekulargewicht von ca. 8200 D, das in guter Übereinstimmung mit dem chromatographisch bestimmten Molekulargewicht von 8000 D steht.

Der core des 16-2-LPS enthält neben Neutralzuckern und Phosphat möglicherweise auch Glucosamin und KDO, die in geringen Prozentsätzen in der OS-Fraktion nachgewiesen wurden. Für ein aus Heptose (1), Glucose (2), Mannose (3), Phosphat (1), KDO (1) und Glucosamin (1) bestehendes Oligosaccharid ergibt sich rechnerisch ein Molekulargewicht von ca. 1500 D. Das gelchromatographisch ermittelte Molekulargewicht der im Elutionsprofil der Abb. 3 zu beobachtenden Schulterfraktion des OS-Gipfels beträgt ebenfalls etwa 1500 D. Möglicherweise ist deshalb in der Schulterfraktion das vollständige Kern-OS des 16-2-LPS enthalten, während der 900 D-Gipfel lediglich ein durch Säureeinfluß degradiertes Teilstück des Kern-OS enthält, das aus einem Heptose-, zwei Glucose- und drei Mannosemolekülen sowie einer Phosphatgruppe besteht.

1.2. Das LPS von R.lupini D75

1.2.1. Isolierung und Reinigung

Wie viele andere Rhizobienstämme produziert der Stamm R.lupini D75 große Mengen extrazellulärer Polysaccharide (EPS). Um eine Kontamination der LPS-Präparation mit EPS zu vermeiden, wurden deshalb die Bakterien vor der Extraktion mit Phenol/Wasser 10mal mit Puffer Saline gewaschen. Das LPS aus der wässrigen Phase der Phenolextraktion wurde dann auf dieselbe Weise wie 16-2-LPS gereinigt. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der resultierenden LPS-Präparation zeigt Abb. 7.

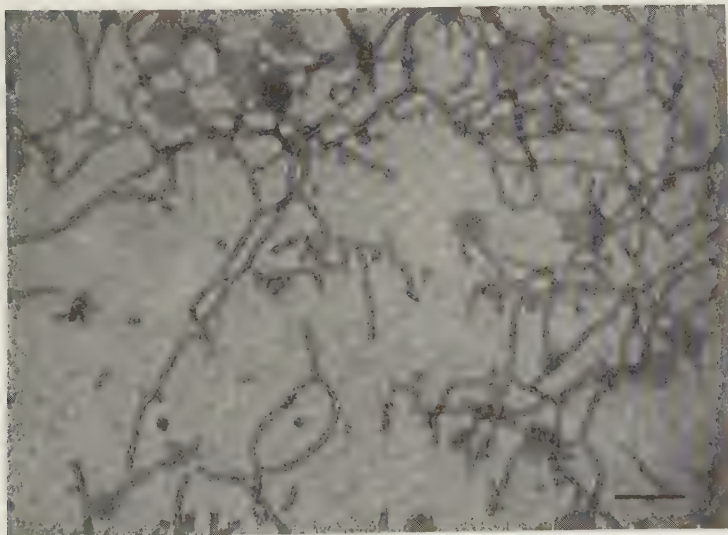


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Darstellung des LPS von R.lupini D75. Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Längenangabe: 200 nm.

1.2.2. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren

Eine gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuremethylester aus dem D75-LPS, mit Margarinsäuremethylester als internem Standard, ist in Abb. 8 dargestellt.

Im Chromatogramm sind 7 Gipfel erkennbar, deren Gewichtsanteil am D75-LPS insgesamt 10,5 % beträgt. Mit einem Anteil von 5,6 % ist β -Hydroxymyristinsäure (3-OH 14:0) die häufigste im D75-LPS vorkommende Fettsäure. Der Anteil der beiden nicht identifizierten Fettsäuren X1 und X2 beträgt 1,7 % bzw. 1,3 %, der der übrigen 4 Fettsäuren zusammen 1,9 % (Tab. 4).

Die Retentionszeiten der beiden Komponenten X1 und X2 sind nicht identisch mit den Retentionszeiten von länger-kettigen gesättigten Fettsäuren (20:0, 22:0) und von -Hydroxyfettsäuren (2-OH 16:0, 2-OH 18:0), die im gleichen Bereich liegen. Möglicherweise sind X1 und X2 längerkettige β -Hydroxyfettsäuren, die charakteristisch für Rhizobien-LPS zu sein scheinen (RUSSA & LORKIEWICZ, 1974; PLANQUE et al., 1979).

Fettsäurebestandteil	Gewichtsprozent
β -Hydroxymyristinsäure	5,6
X1	1,7
X2	1,3
Andere Fettsäuren	1,9

Tab. 4: Fettsäurebestandteile des LPS von R.lupini D75.
Erläuterungen im Text.

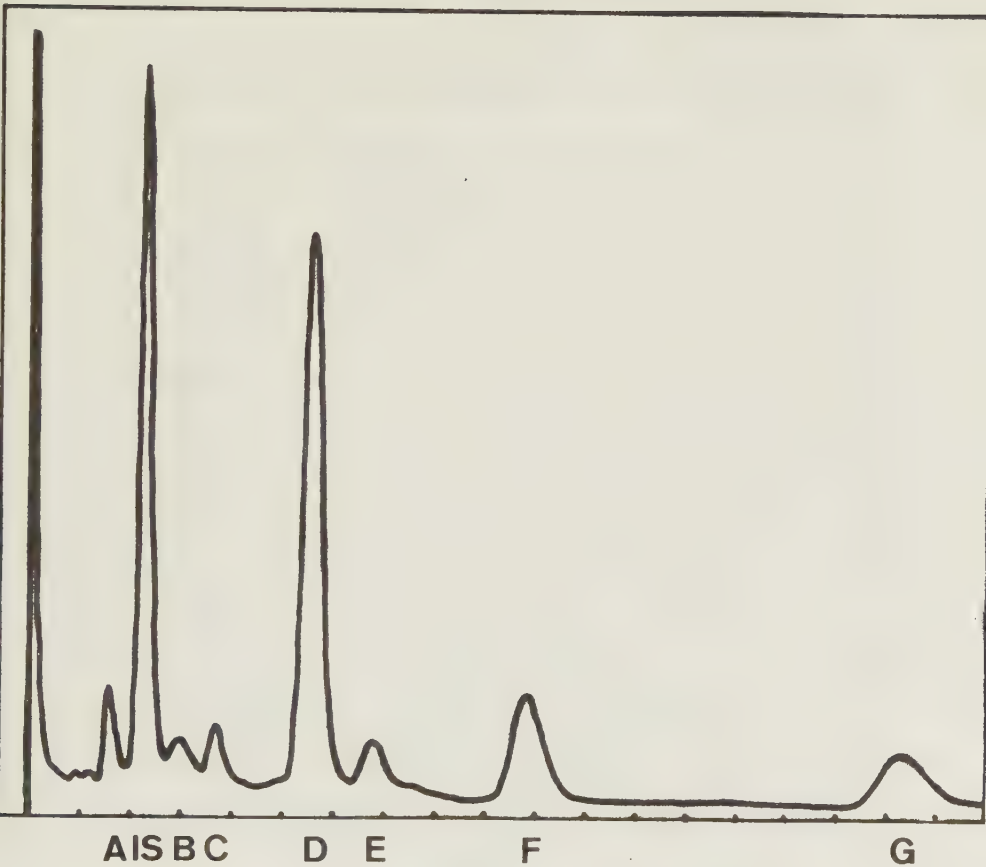


Abb. 8: Gaschromatogramm der Fettsäuren aus dem D75-LPS.
Säulentemperatur: 185°C isotherm. Einheit 2min.
A = 16:0, B = 18:0, C = X3, D = 3-OH 14:0,
E = 2-OH 16:0, F = X1, G = X2, IS = 17:0 als
interner Standard.

1.2.3. Zucker- und Phosphatgehalt

Als Neutralzucker der D75-LPS konnten dünn-schichtchromatographisch Rhamnose, Xylose, Mannose und Galactose identifiziert werden.

Die dünn-schichtchromatographisch bestimmten Zucker wurden auch gaschromatographisch nachgewiesen (Abb. 9). Die Retentionszeit der im Chromatogramm der Abb. 9 zu beobachtenden Schulter des Galactosegipfels entspricht der von Glucose, die aber dünn-schichtchromatographisch nicht in Erscheinung trat. Aus den Gipfel-flächen wurde, bezogen auf Rhamnose = 5, folgendes molares Verhältnis der Neutralzuckerbestandteile des D75-LPS errechnet: Rhamnose (5) : Xylose (0,9) : Mannose (0,6) : Galactose (0,9).

Neben den Neutralzuckern enthält das D75-LPS 2,5 % KDO, 6,0 % Glucosamin und 4,7 % Phosphat. Die Gewichtsanteile dieser Komponenten wurden durch spezifische Farbstests bestimmt. Um eine Beziehung zwischen den gaschromatographisch bestimmten molaren Verhältnissen der Neutralzucker und den molaren Verhältnissen der übrigen Komponenten herstellen zu können, wurde der Mannosegehalt des D75-LPS kolorimetrisch nach DISCHE & SHETTLES (1948) bestimmt. Er beträgt 18,5 %. Die resultierenden molaren Verhältnisse der Einzelkomponenten sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Der mit Phenol-Schwefelsäure bestimmte Gesamtzucker-gehalt beträgt 32 %; die Werte der einzeln bestimmten Zucker summieren sich zu 36 %.

1.2.4. Untersuchung der Zuckerseitenkette

1.2.4.1. Gelchromatographische Bestimmung des Molekulargewichts

Die durch milde Hydrolyse mit 1 % Essigsäure freigesetzten Saccharide des D75-LPS wurden durch Gelchromatographie an

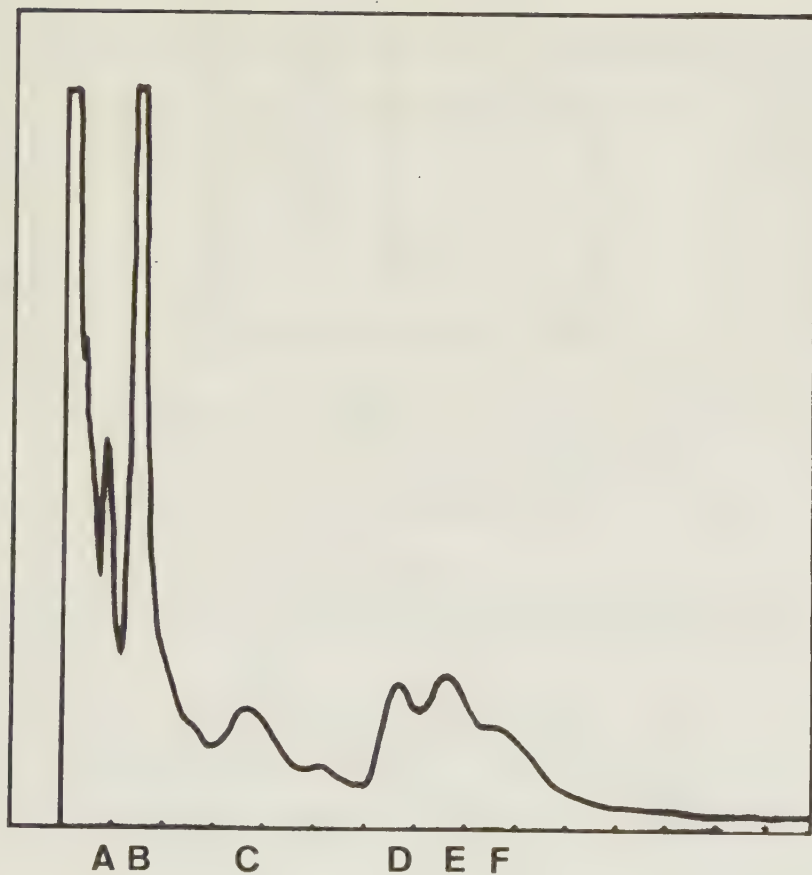


Abb. 9: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus D75-LPS.

Stulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.

A = Desoxypentose oder Didesoxyhexose, B = Rhamnose,
C = Xylose, D = Mannose, E = Galactose, F = Glucose.

Komponente	Gew. %	mV
Xylose	3,0 ⁺	0,9
Mannose	2,4 ⁺	0,6
Galactose	3,6 ⁺	0,9
Rhamnose	18,5	5,0
Glucosamin	6,0	1,5
KDO	2,5	0,4
Phosphat	4,7	2,3

Tab. 5: Zucker- und Phosphatgehalt des D75-LPS.

mV = molares Verhältnis, bezogen auf Rhamnose = 5,0.

⁺ : aus der gaschromatographisch bestimmten Gipfel-
fläche berechneter Wert. Als Bezugsgröße diente
Rhamnose, deren Gipfelhöhe gleich 18,5 % gesetzt
wurde.

Der durch das Phenol-Schwefelsäure-Reagenz (DUBOIS
et al., 1955) bestimmte Gesamtzuckeranteil der ver-
wendeten LPS-Präparation beträgt 32 %.

einer geeichten Sephadex G50-Säule (Abb.10) gereinigt. Es
konnte nur eine Oligosaccharidfraktion isoliert werden (Abb.11),
deren aus dem Elutionsvolumen bestimmtes Molekulargewicht
ca. 1400 D beträgt.

Das D75-LPS ist deshalb vermutlich ein rough- oder semi-
rough-LPS.

1.2.4.2. Chemische Zusammensetzung des Oligosaccharid-Teils

Alle gaschromatographisch bestimmten Neutralzucker des
D75-LPS fanden sich im gleichen molaren Verhältnis auch
in isolierten OS (Abb.12). Als weitere Komponenten
wurden Glucosamin mit 4,7 %, KDO mit 3,9 % und Phosphat

MGx10⁻²

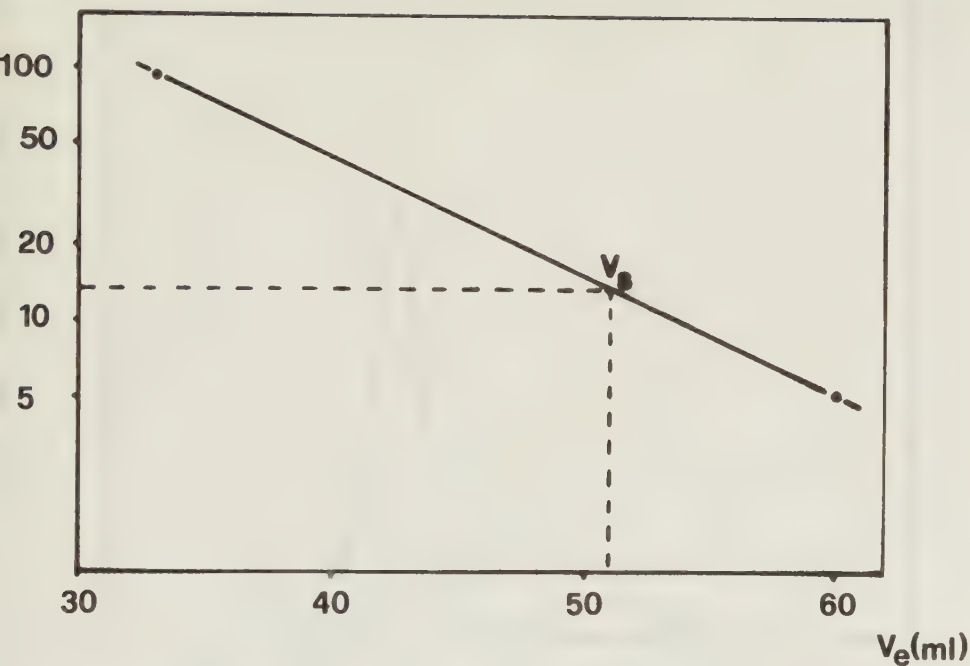


Abb.10: Eichkurve der zur Reinigung des D75-OS benutzten Sephadex G50-Säule; geeicht mit Dextran 9400 ($V_e = 33$ ml) und Raffinose ($V_e = 60$ ml). Das Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Dextran 500000 bestimmt: $V_0 = 32$ ml. Elutionsmittel: Pyridin-Acetatpuffer (siehe Methoden). Es ist der Logarithmus des Molekulargewichts gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

Elutionsvolumen des D75-OS: $V_S = 51$ ml.

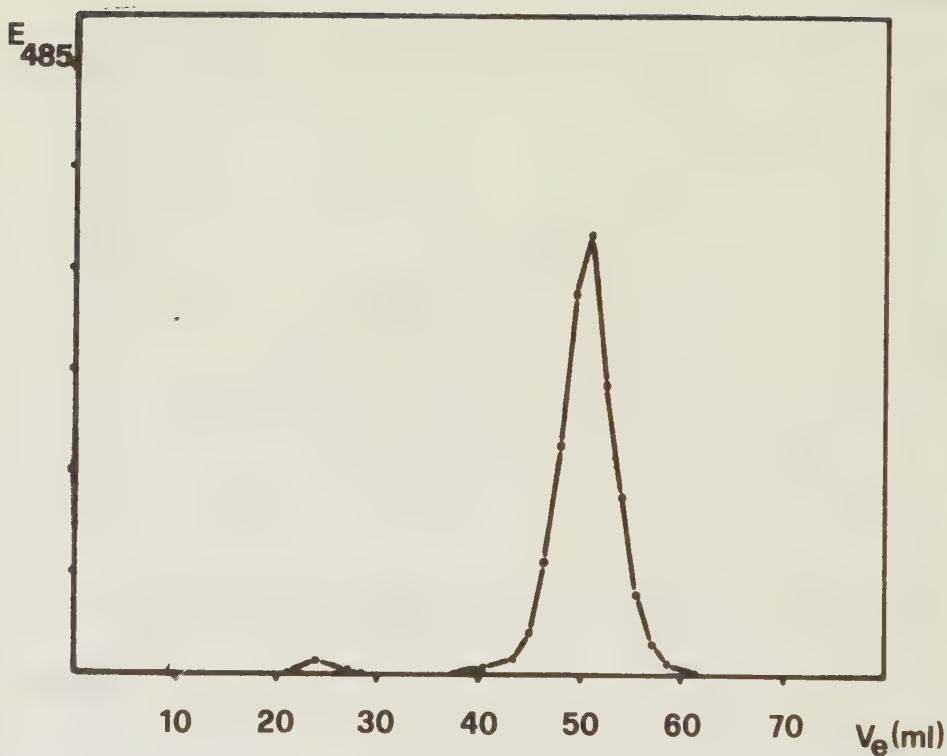


Abb.11: Reinigung der Zuckerkette von D75-LPS an einer Sephadex G50-Säule. Der relative Zuckergehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Phenol/Schwefelsäure (DUBOIS et al., 1955) bestimmt und als Extinktion bei 485 nm gegen das Elutionsvolumen V_e aufgetragen. Säulenparameter siehe Material und Methoden.

mit 7,1 % Gewichtsanteil an der OS-Präparation nachgewiesen. Aus dem Rhamnoseanteil von 28 % lassen sich die in Tab. 6 angegebenen Werte für die molaren Verhältnisse aller im D75-OS nachgewiesenen Bestandteile errechnen.

Komponente	Gew. %	mV
Xylose	4,5 ⁺	0,9
Mannose	3,6 ⁺	0,6
Galactose	5,5 ⁺	0,9
Rhamnose	28,0	5,0
Glucosamin	4,7	0,8
KDO	3,9	0,5
Phosphat	7,1	2,4

Tab. 6: Zucker- und Phosphatgehalt des D75-OS.

mV = molares Verhältnis, bezogen auf Rhamnose = 5,0.

⁺ : berechneter Gewichtsanteil wie in Tab. 5 angegeben. Bezugsgröße: Rhamnose = 28,0 %.

Gesamtzuckergehalt der D75-OS-Präparation nach der Phenol-Schwefelsäure-Methode (DUBOIS et al., 1955): 46 %.

Wie ein Vergleich der in Tab. 5 und Tab. 6 angeführten molaren Verhältnisse zeigt, sind mit Ausnahme von Glucosamin, das im LPS um den Faktor 2 angereichert ist, alle der im D75-LPS nachgewiesenen Zucker- und Phosphatkomponenten Bestandteile des D75-OS. Mit Hilfe des Phenol-Schwefelsäure-Verfahrens wurde ein Gesamtzuckergehalt der D75-OS-Präparation von 46 % ermittelt. Da die Summe der durch Farbttests bestimmten und nach Gaschromatogrammen errechneten Prozentwerte der einzelnen Zuckerkomponenten (Tab. 6) 50,2 % beträgt, sind im D75-OS neben den in Tab. 6 verzeichneten Zuckerbestandteilen wahrscheinlich keine weiteren enthalten.

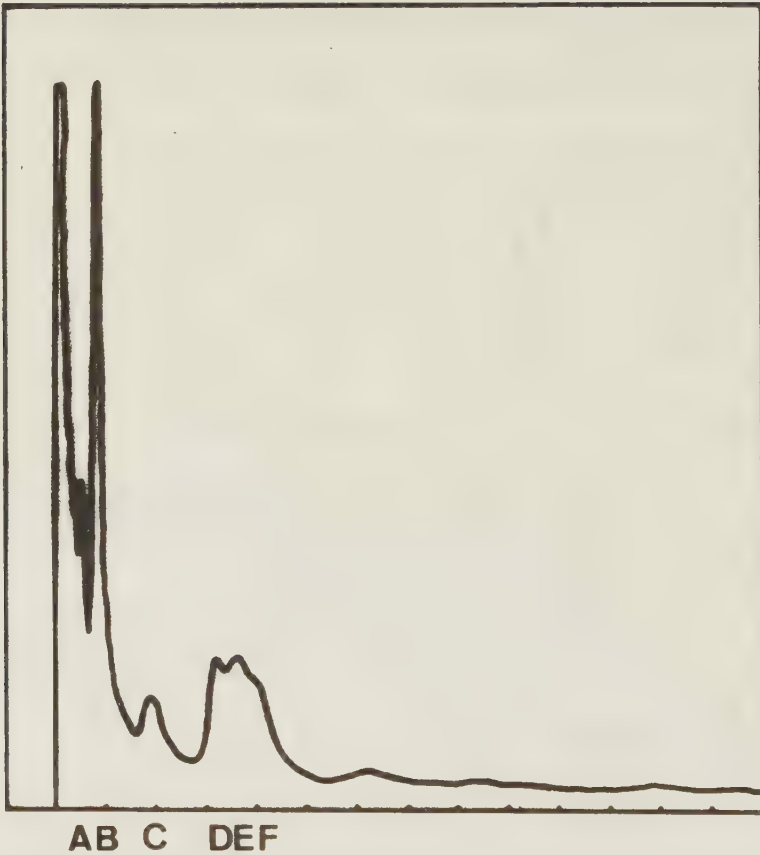


Abb. 12: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus der Zuckerkette des D75-LPS. Säulentemperatur: 185°C isotherm. Einheit 2 min.

A = Desoxypentose oder Didesoxyhexose, B = Rhamnose, C = Xylose, D = Mannose, E = Galactose, F = Glucose.

Das Molekulargewicht eines Zuckerpolymers, das aus den Komponenten Xylose, Mannose, Galactose, Glucosamin, KDO und Rhamnose im Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 5 besteht (Tab. 6), läßt sich zu ca. 1600 D berechnen, ein Wert, der in der Nähe des gelchromatographisch bestimmten Molekulargewichts des D75-OS von ca. 1400 D liegt.

Aus der Summe der Molekulargewichte der einzelnen Komponenten des D75-OS ergibt sich einschließlich zweier Phosphatgruppen ein Molekulargewicht von ca. 1760 D.

1.3. Wechselwirkung von D75-LPS mit einem aus Lupinensamen isolierten Agglutinin

Lupinenlektine wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Über ihre Eigenschaften ist deshalb nichts bekannt.

Aus den Samen von Lupinus angustifolius wurde aber kürzlich eine Substanz mit der Fähigkeit zur Erythrozytenagglutination isoliert. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen, Proteinbestandteile enthaltenden Leguminosenlektinen ist dieses Agglutinin jedoch ein reines Polysaccharid (BRÜCKNER, persönliche Mitteilung).

In einer Ouchterlony-Immundiffusion des Lupinus-Agglutinins gegen D75-LPS nach der bei KAMBERGER (1979a) beschriebenen Methode trat keine Präzipitationsbande auf.

2. Die Wechselwirkung zwischen 16-2-LPS und INCO-Partikeln

Der dem Bakterienstamm 16-2 nahe verwandte Stamm 16-3 produziert ein phagenschwanzähnliches Bacteriocin (INCO), das an Zellen des Stammes 16-2 adsorbiert und diese abtötet (LOTZ & MAYER, 1972). Struktur und Adsorptionsmechanismus des INCO-Phagen sind im Rahmen der Charakterisierung defekter Bakteriophagen von Rhizobium ausführlich untersucht worden (LOTZ, 1976; PFISTER & BURKARDT, 1978). Nach der Identifizierung des 16-2-LPS als INCO-Rezeptor (PFISTER & LODDERSTAEDT, 1977) und der Aufklärung des Aufbaus von 16-2-LPS ergab sich die Möglichkeit, die mehr am Rande des Themas liegenden Fragen der Wechselwirkung zwischen 16-2-LPS und INCO-Partikeln aufzugreifen und zu klären.

2.1. Quantitativer Ausbau des Testsystems zur Bestimmung der INCO-Aktivität

Defekte Bakteriophagen sind frei von DNS und daher unfähig, sich in den befallenen Zellen zu vermehren. Eine Titerung durch Auszählen von Plaques in einem sensitiven Bakterienrasen ist deshalb nicht möglich. Die bakterizide Aktivität einer INCO-Suspension wurde bisher mit einem halbquantitativen Tropftest nach OZEKI (1968) erfaßt und ist als der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe ($1/2$, $1/4$, $1/8$, ...) definiert, bei der ein Tropfen des Lysats auf einen Rasen von 16-2-Bakterien gerade noch eine sichtbare Hemmung des Wachstums erzeugt. Eine durch Inkubation mit rezeptoraktivem LPS bedingte Hemmung der INCO-Aktivität kann so in % inaktivierter INCO-Partikel angegeben werden. Der Test erlaubt jedoch keine Aussagen über die absolute Zahl inaktivierter Phagen. Die Bestimmung des Titers einer INCO-Suspension ist nur indirekt möglich. Die während der Inkubation von

Phagen und Bakterien erfolgende statistische Verteilung der Adsorption wird durch die sog. Poisson-Verteilung beschrieben:

$$P(k) = \frac{e^{-m} m^k}{k!}$$

wobei: m = Multiplizität
k = Anzahl adsorbierter Phagen pro Zelle
P(k) = Anzahl Zellen mit k adsorbierten Phagen

Bei gegebener Multiplizität der Infektion läßt sich damit derjenige Prozentsatz P(k) der Zellen berechnen, an den k Viruspartikel adsorbiert sind. Bei einer Multiplizität von 1 ist die Anzahl der nicht infizierten und damit überlebenden Zellen 37 %; der Phagentiter ist in diesem Fall gleich dem Bakterientiter. Von dem bekannten Bakterientiter konnte so bei einer Überlebensrate von 37 % auf den Titer des INCO-Lysats geschlossen werden.

Der Vergleich mit den Ergebnissen parallel laufender Tropftests ergab einen Titer von 10^9 Partikeln bei einer Aktivität des INCO-Lysats bis zur Verdünnung von 1/256.

2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen INCO-Partikeln und isoliertem 16-2-LPS

Die Wechselwirkung zwischen INCO-Phagen und 16-2-LPS konnte direkt durch elektronenmikroskopische Präparation gezeigt werden. Dazu wurden 50 µg 16-2-LPS mit 0,3 ml INCO-Lysat (Titer 10^{10} /ml) in Puffer Saline gemischt, 30 min. bei 30°C inkubiert und nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat im Elektronenmikroskop betrachtet. Wie in Abb. 13 gezeigt, treten im Bereich der LPS-Stränge gehäuft kontrahierte INCO-Partikel auf. Die inneren Röhren und die Schwanzfasern sind meist auf die LPS-Bänder ausgerichtet. Offensichtlich werden alle zur Kontraktion des Phagenschwanzes notwendigen Schritte durch das LPS ausgelöst.

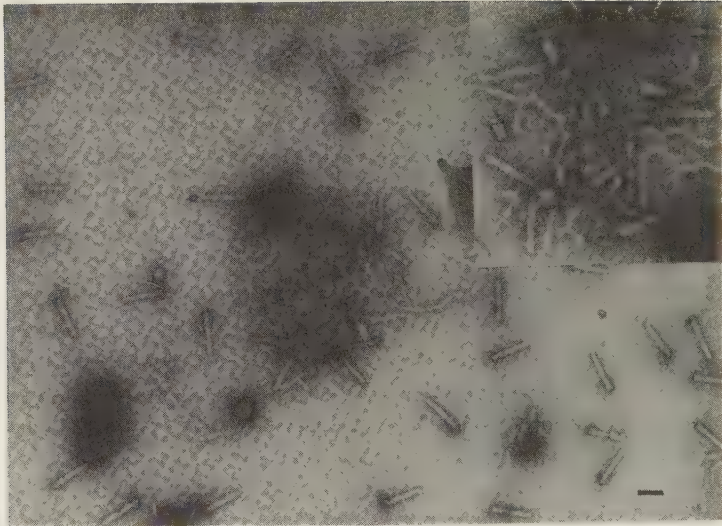


Abb.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme von INCO-Partikeln, die mit 16-2-LPS inkubiert wurden. Die an das 16-2-LPS adsorbierten und kontrahierten Partikel (Pfeile) sind im Einsatz bei stärkerer Vergrößerung dargestellt. Kontrastierung mit Uranylacetat. Längenangabe: 100 nm.

Da nach Inkubation der INCO-Partikel mit dem LPS des INCO-resistenten Stammes 16-2/I1 keine am LPS adsorbierten INCO-Partikel zu beobachten waren (Abb. 14), kann geschlossen werden, daß sowohl Adsorption als auch Kontraktion der Partikel spezifisch nur am LPS des sensitiven Stammes stattfinden.

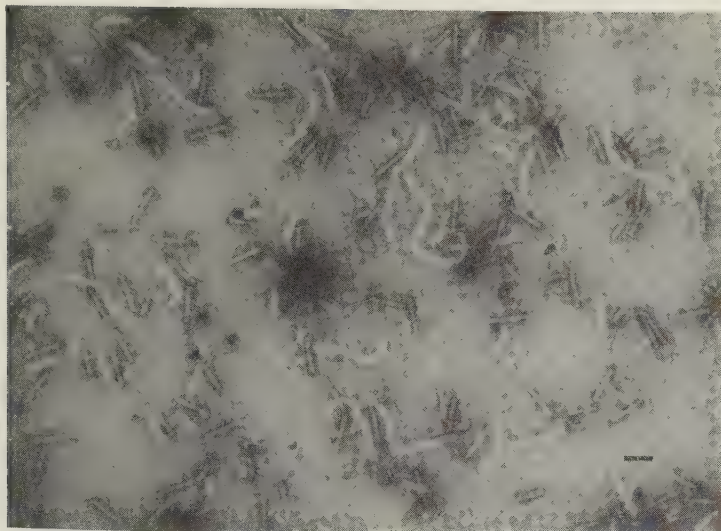


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von INCO-Partikeln, die mit 16-2/I1-LPS inkubiert wurden. Kontrastierung mit Uranylacetat. Längenangabe: 100 nm.

Der in Abb. 13 zu beobachtende hohe Anteil unkontrahierter Phagen ist sehr wahrscheinlich biologisch inaktiv, da die bakterizide Aktivität des Lysats unter den oben beschriebenen Bedingungen auf 1% reduziert wurde. Die quantitative Wechselwirkung des 16-2-LPS mit aktiven INCO-Partikeln wurde durch folgendes Experiment bestätigt: mit 16-2-LPS präinkubierte INCO-Partikel wurden mit Zellen des sensitiven Stammes 16-2 inkubiert. An den Zellen konnten keine adsorbierten INCO-Partikel nachgewiesen werden (Abb. 15). Nach Präinkubation mit LPS des INCO-resistenten Stammes 16-2/I1, das die Phagen nicht inaktiviert, waren die

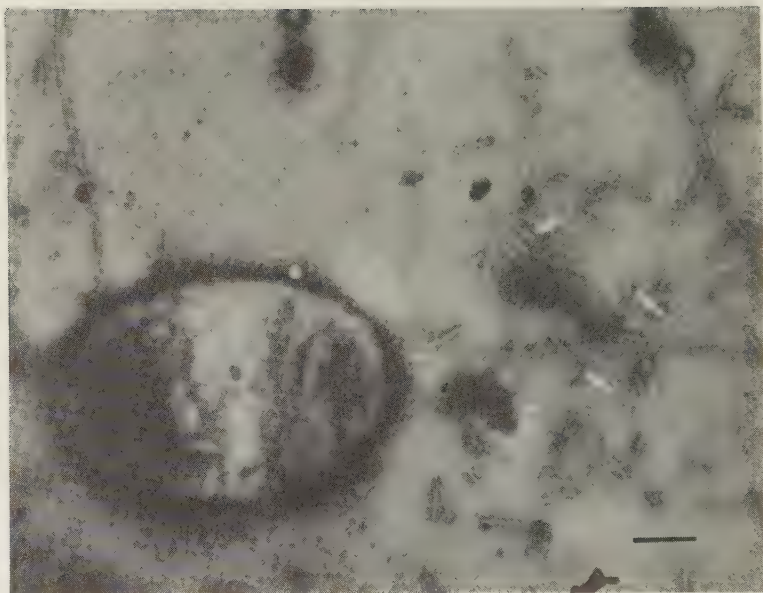


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von INCO-Partikeln, die nach Präinkubation mit 16-2-LPS mit sensitiven 16-2-Zellen inkubiert wurden. Die INCO-Phagen sind am LPS adsorbiert (Pfeile). Auf der Zelloberfläche sind keine adsorbierten INCO-Partikel zu beobachten. Kontrastierung mit Uranylacetat. Längenangabe: 200 nm.

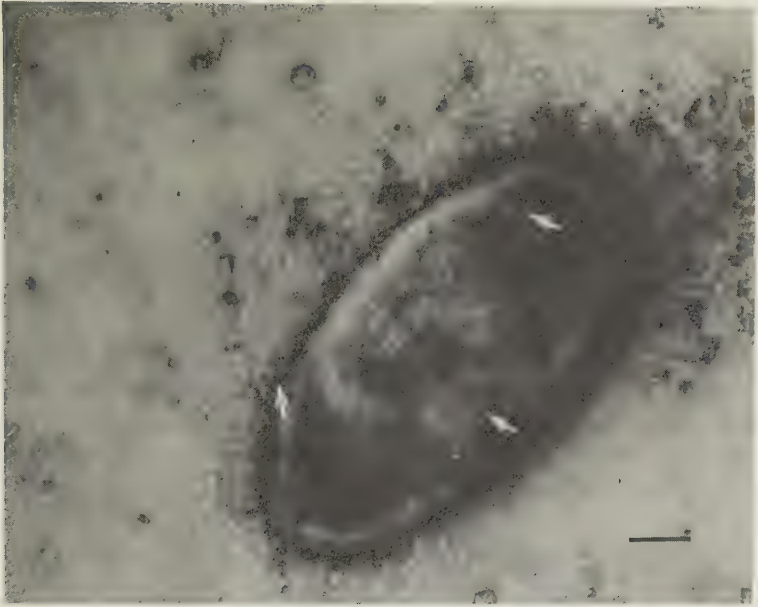


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahme von INCO-Partikeln, die nach Präinkubation mit 16-2/I1-LPS mit sensitiven 16-2-Zellen inkubiert wurden. Die Zelloberfläche der 16-2-Zellen ist dicht mit kontrahierten INCO-Partikeln (Pfeile) besetzt. Kontrastierung mit Uranylacetat. Längenangabe: 200 nm.

Zellen dagegen dicht mit kontrahierten INCO-Partikeln besetzt (Abb. 16). In beiden Präparaten sind inaktive, unkontrahierte INCO-Partikel zu beobachten, die nicht mit den Bakterienzellen wechselwirken.

2.3. Rezeptoraktive Region des INCO-Phagen auf dem 16-2-LPS

Eine Hemmung der Phagenadsorption an die Bakterienzellen durch eine Zuckerkomponente der Zellwand ist bei WATANABE & TAKESUE (1975) beschrieben. Die Autoren vermuten, daß diese Komponente ein für die Phagenadsorption entscheidender Bestandteil des Rezeptors ist.

Versuche zur Hemmung der INCO-Adsorption an 16-2-Zellen durch einzelne, als Bestandteile des 16-2-LPS nachgewiesene Monosaccharide schlugen jedoch fehl. Die Rezeptoraktivität ist demnach nicht an die in diesen Monosacchariden vorliegenden Strukturen gebunden.

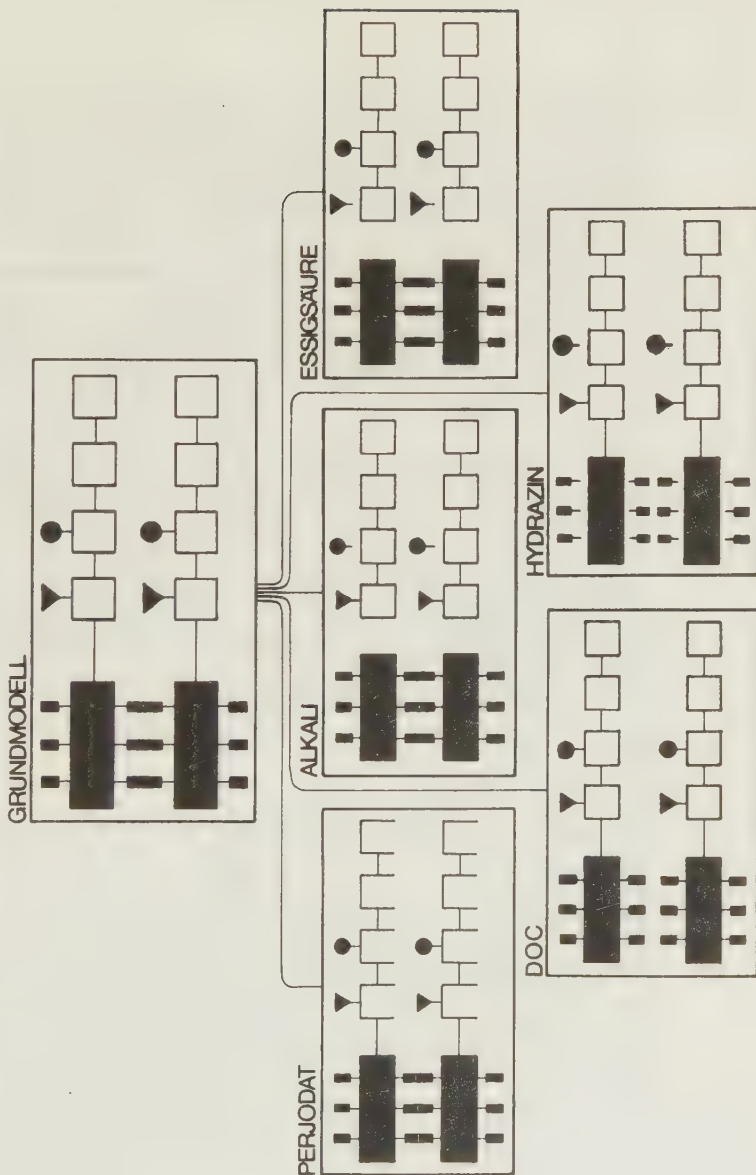
2.3.1. Strukturelle Voraussetzungen für die Rezeptoraktivität

Durch Behandlung mit spezifisch wirkenden Agentien sind gezielte Veränderungen der LPS-Struktur möglich (Abb. 17). Zur näheren Charakterisierung der strukturellen Voraussetzungen für die biologische Aktivität des 16-2-LPS wurde die Sensitivität der Rezeptoraktivität gegen solche Agentien bestimmt.

Durch Oxydation mit Perjodsäure wurde die Rezeptoraktivität des 16-2-LPS völlig zerstört (Tab. 7). Perjodat bewirkt eine Spaltung vicinaler Hydroxylgruppen. Da die Hydroxylgruppen des Lipoid A mit Fettsäuren verestert sind, bleibt dieser Teil des LPS intakt. Die durch Perjodat oxydierbaren Zuckerbausteine der rezeptoraktiven Region sind deshalb Bestandteile der AS-Seitenkette des 16-2-LPS.

Abb. 17: Auswirkung verschiedener Agentien auf die Struktur eines LPS-Moleküls (schematisch)

 = Glucosamingrundgerüst des Lipoid A
 = Monosaccharideinheit
 = Acetylgruppe
 = Pyruvatgruppe



Durch die Behandlung des 16-2-LPS mit Alkali (0,1 N Ba(OH)₂) erfolgt ebenfalls eine irreversible Rezeptorinaktivierung (Tab. 7). Durch die Einwirkung von Alkali werden KDO-Bindungen im LPS-Molekül gespalten und Acetylgruppen vom PS abgetrennt.

Nach milder Hydrolyse des LPS mit 1% Essigsäure bleiben dagegen die Bindungen der Acetylgruppen an das PS bestehen. In diesem Fall werden jedoch Ketal- und Acetalbindungen, z.B. von Pyruvatgruppen, gespalten. Auch das so gewonnene PS wies keine Rezeptoraktivität auf (Tab. 7).

Eine Abspaltung der hydrophoben Ester- und Amidsubstituenten des LPS durch Hydrazinolyse schließlich führte ebenfalls zum Verlust der Rezeptoraktivität (Tab. 7).

Vorbehandlung des LPS	Rezeptoraktivität
Perjodatoxydation	1
milde Hydrolyse (1% Essigsäure)	1
Alkali (pH 13)	1
Hydrazinolyse	1
Inkubation mit Antiserum	1
Desoxychololat	1
Desoxychololat, anschl. Dialyse	64
unbehandelt	64

Tab. 7: Sensitivität der LPS-Rezeptoraktivität gegen verschiedene Agentien. Rezeptoraktivität = INCO-Aktivität vor Inkubation mit LPS/INCO-Aktivität nach Inkubation mit LPS.

Diese Daten lassen den Schluß zu, daß der rezeptor-aktive Bereich des INCO-Phagen im PS-Teil des 16-2-LPS lokalisiert ist und möglicherweise Zuckersubstituenten wie Acetyl- oder Pyruvatgruppen umfaßt. Ein zusätzlicher Hinweis darauf ergibt sich aus folgendem Experiment: Nach Inkubation mit 16-2-Antiserum zeigte 16-2-LPS keine Rezeptoraktivität (Tab.7). Anscheinend blockieren die an das PS des LPS angelagerten Antikörper die für die Adsorption des Phagen notwendigen Bindungsstellen.

Auch die micellare Struktur des LPS scheint eine Voraussetzung für die Inaktivierung der INCO-Partikel zu sein, da 16-2-LPS in Gegenwart von Desoxycholat (1 %) keine Rezeptoraktivität zeigte (Tab.7). Die Wirkung von Desoxycholat beruht auf einer Anlagerung der Substanz an den Lipidteil der LPS-Moleküle und einer dadurch bedingten Auflösung der LPS-Aggregate, die sich konzentrationsabhängig im Elektronenmikroskop verfolgen läßt. Nach Entfernung des Detergenz durch Dialyse gegen Puffer wurde die volle Rezeptoraktivität wiederhergestellt (Tab. 7).

2.3.2. Die LPS INCO-resistenter Mutanten

Durch die bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Rezeptoraktivität des 16-2-LPS an den PS-Teil gebunden und von einer bestimmten sterischen Anordnung der Zuckerketten abhängig ist. Zur weiteren Eingrenzung des rezeptoraktiven Bereichs wurden die LPS INCO-resistenter Mutanten mit dem LPS des wildtyps verglichen.

2.3.2.1. Isolierung INCO-resistenter Mutanten

Alle isolierten Mutanten waren Spontanmutanten, die nach Auftropfen einer hochtitrigen INCO-Suspension (10^{10} /ml) auf einen Rasen von 16-2-Bakterien als resistente Kolonien in Erscheinung traten. Eine LPS-bezogene Phagentypisierung der Mutanten war nicht möglich, da die 5 für den Stamm 16-2 vorhandenen virulenten Phagen durch 16-2-LPS nicht inaktiviert wurden, ihre Rezeptoren also wahrscheinlich in anderen Membrankomponenten liegen. Durch ihre Sensitivität gegenüber den virulenten Phagen konnte aber die Abstammung der isolierten Mutantenstämme vom Stamm 16-2 nachgewiesen werden. Alle untersuchten Mutanten, einschließlich der bereits vorhandenen Spontanmutante 16-2/I1 (LOTZ & MAYER, 1972), zeigten eine vom Wildtyp leicht abweichende Kolonieform. Typische rough-Kolonieformen waren in keinem Fall zu beobachten.

2.3.2.2. Serologischer Vergleich von wildtyp- und Mutanten-LPS

Der Verwandtschaftsgrad der Mutanten wurde serologisch durch einen Hämagglutinationshemmtest bestimmt, dessen Ergebnisse in Tab. 8 dargestellt sind. Diesem Test liegt folgendes Prinzip zugrunde: Erythrozyten, deren Oberfläche mit einem Antigen beladen wird, werden durch das entsprechende Antiserum agglutiniert. Durch Präinkubation des Antiserums mit Antigen in verschiedenen Verdünnungen wird die Erythrozytenagglutination bis zu einer bestimmten Antigen-Verdünnungsstufe gehemmt, die ein Maß für den Titer der gegen das Antigen gerichteten Antikörper des Antiserums ist.

Die im Versuch verwendeten "Hemmstofflösungen" waren Übernachtkulturen des Wildtypstammes 16-2 und der 8 Mutantenstämme, die nach Hitzetötung mit Wasser und

Aceton gewaschen, lyophilisiert und dann zu 10 mg/ml suspendiert wurden. Die verschiedenen Verdünnungen ($1/2$, $1/4$, $1/8$, ...) wurden nun mit konstanten Konzentrationen eines von Kaninchen produzierten Antiserums gegen den Stamm 16-2 inkubiert. Je größer die Affinität des Antiserums gegenüber den LPS auf der Zelloberfläche der Bakterien ist, desto höher wird diejenige Verdünnungsstufe sein, bei der noch eine Hämaggglutination der später hinzugegebenen, mit dem Antigen (16-2-LPS) beladenen Erythrozyten eintritt.

Getesteter Bakterienstamm	Hämaggglutinationshemmung bis Verdünnung
16-2 (Wildtyp)	$1/64$
16-2/I1	$1/16$
16-2/42	$1/16$
16-2/3	$1/8$
16-2/4	$1/8$
16-2/56	$1/8$
16-2/1	$1/4$
16-2/32	$1/4$

Tab. 8: Serologischer Vergleich von 16-2-LPS mit den LPS INCO-resistenter Mutantenstämmen. Hämaggglutinationshemmtest mit Antiserum gegen 16-2-LPS.

Das Antiserum weist gegenüber 16-2-Zellen hohe, gegenüber den Zellen der Mutantenstämmen niedrigere Titer auf. Den höchsten serologischen Verwandtschaftsgrad zum Wildtyp besitzen die Mutanten 16-2/I1 und 16-2/42, gefolgt von den Stämmen 16-2/3, 16-2/4 und 16-2/56 und schließlich den Stämmen 16-2/1 und 16-2/32 (Tab. 8).

Bei der Ouchterlony-Immundiffusion von 16-2-Antiserum gegen 16-2-LPS und die LPS der Mutanten fällt die große Ähnlichkeit des Bandenmusters von 16-2- und 16-2/I1-LPS auf. Der Unterschied zwischen den beiden LPS ist lediglich durch den "Spike" sichtbar, den eine der beiden 16-2-Präzipitationslinien gegenüber der entsprechenden, bei allen Mutanten-LPS auftretenden, 16-2/I1-Bande ausgebildet. Eine zweite Präzipitationslinie ist nur 16-2- und 16-2/I1-LPS gemeinsam. Ein Beispiel für einen der durchgeführten Immundiffusionstests zeigt Abb. 18.

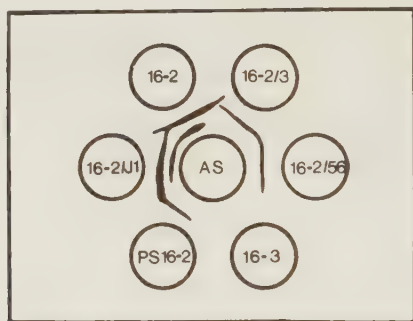


Abb. 18: Ouchterlony-Immundiffusion von 16-2-Antiserum gegen 16-2- und 16-3-LPS, reines PS von 16-2-LPS und gegen die LPS verschiedener Mutanten.
AS = 16-2-Antiserum. PS 16-2 = Zuckerkette des 16-2-LPS (nach Hydrolyse mit 1 % Essigsäure erhalten).

2.3.2.3. Gaschromatographische Analyse der Neutralzucker aus ausgewählten Mutanten-LPS

Die LPS der 4 Mutantenstämme 16-2/I1, 16-2/3, 16-2/56 und 16-2/32 repräsentieren das Spektrum der durch Häm-agglutinationshemmtest bestimmten serologischen Verwandtschaftsgrade zum Wildtyp-LPS und wurden deshalb für eine gaschromatographische Analyse der Neutralzucker ausgewählt.

Die Chromatogramme der untersuchten Mutanten-LPS ähneln stark denen des Wildtyp-LPS (Abb. 19, 20, 21, 22). Wie bei 16-2-LPS ist Rhamnose die dominierende Komponente der 4 Mutanten-LPS. Die in Abb.21 erkennbare Schulter des Rhamnosegipfels (Gipfel A) deutet auf die Anwesenheit von Fucose im 16-2/56-LPS hin. 16-2/32-LPS schließlich enthält neben Rhamnose noch eine zweite, nicht identifizierte Neutralzuckerkomponente (Gipfel B, Abb.22). Die nach der Cystein-Schwefelsäure-Methode von DISCHE & SHETTLES (1948) bestimmten Werte des Rhamnosegehalts der Mutanten-LPS (Tab. 9) liegen zwischen 27 % (16-2/3-LPS) und 43 % (16-2/I1-LPS).

LPS	Rhamnosegehalt(%)
16-2 (Wildtyp)	37
16-2/I1	43
16-2/56	34
16-2/32	29
16-2/3	27

Tab. 9: Vergleich des Rhamnosegehalts von 16-2-LPS und der LPS verschiedener Mutantenstämme. Der Rhamnosegehalt wurde nach DISCHE & SHETTLES (1948) bestimmt.

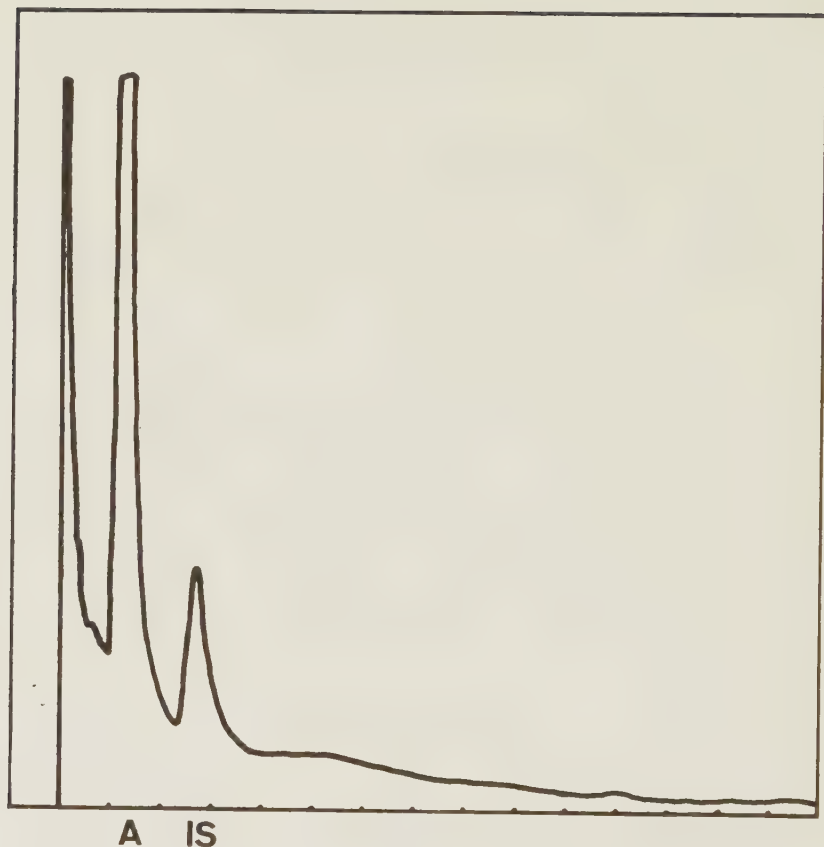


Abb. 19: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus dem LPS der INCC-resistenten Mutante 16-2/I1.
Säulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.
A = Rhamnose, IS = Xylosè als interner Standard.

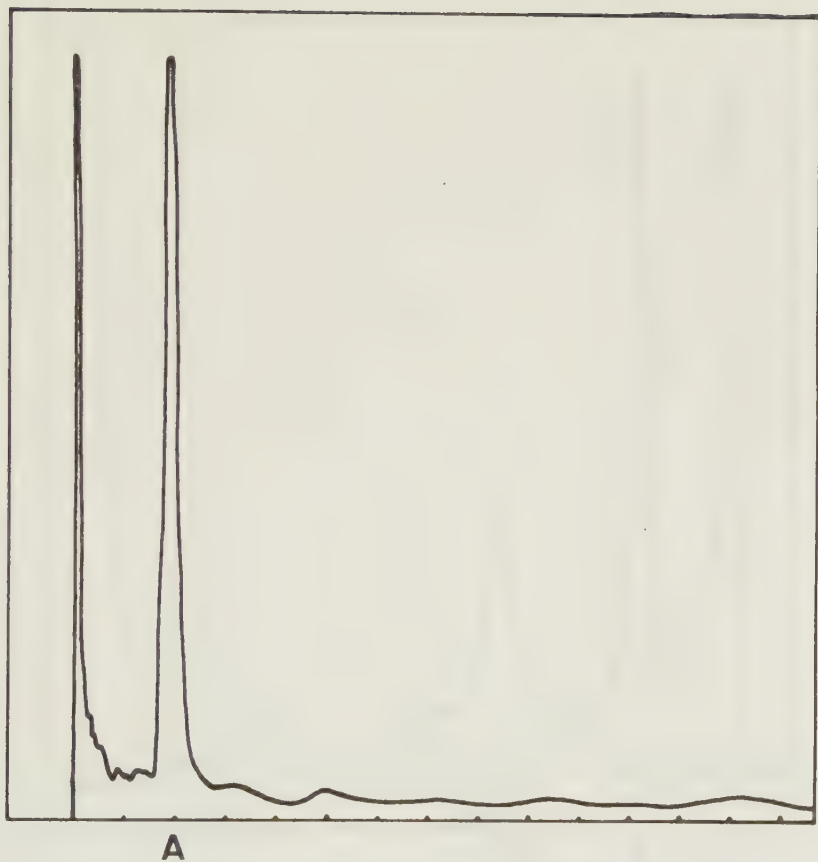


Abb. 20: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus dem LPS der
IMCO-resistenten Mutante 16-2/3.
Säulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.
A = Rhamnose.

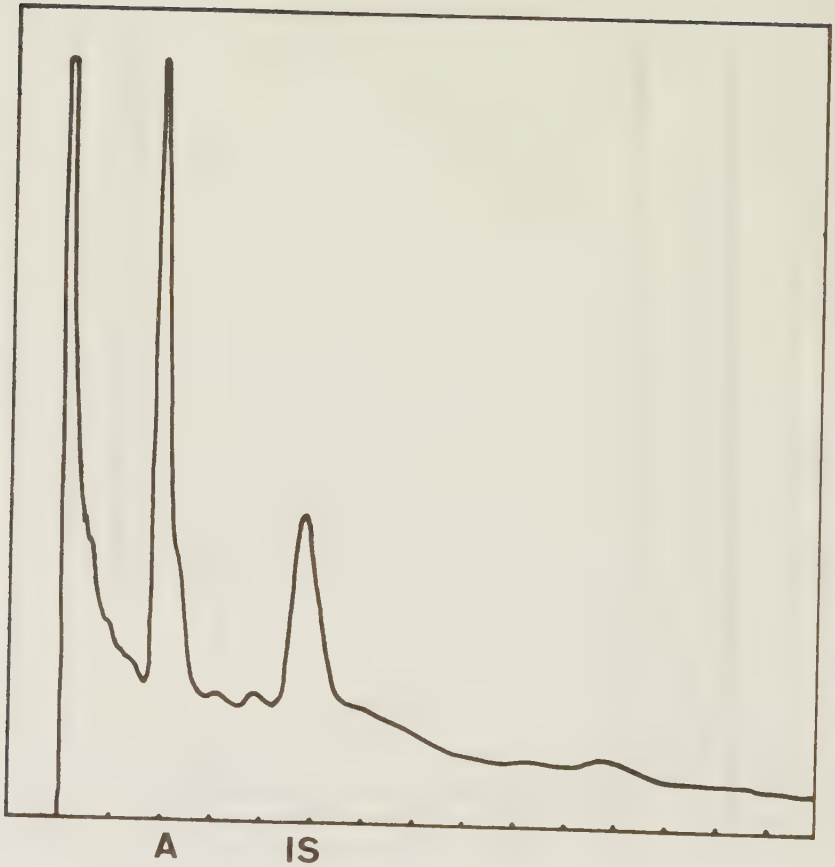


Abb. 21: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus dem LPS der INCO-resistenten Mutante 16-2/56.
Säulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.
A = Rhamnose, IS = Xylose als interner Standard.

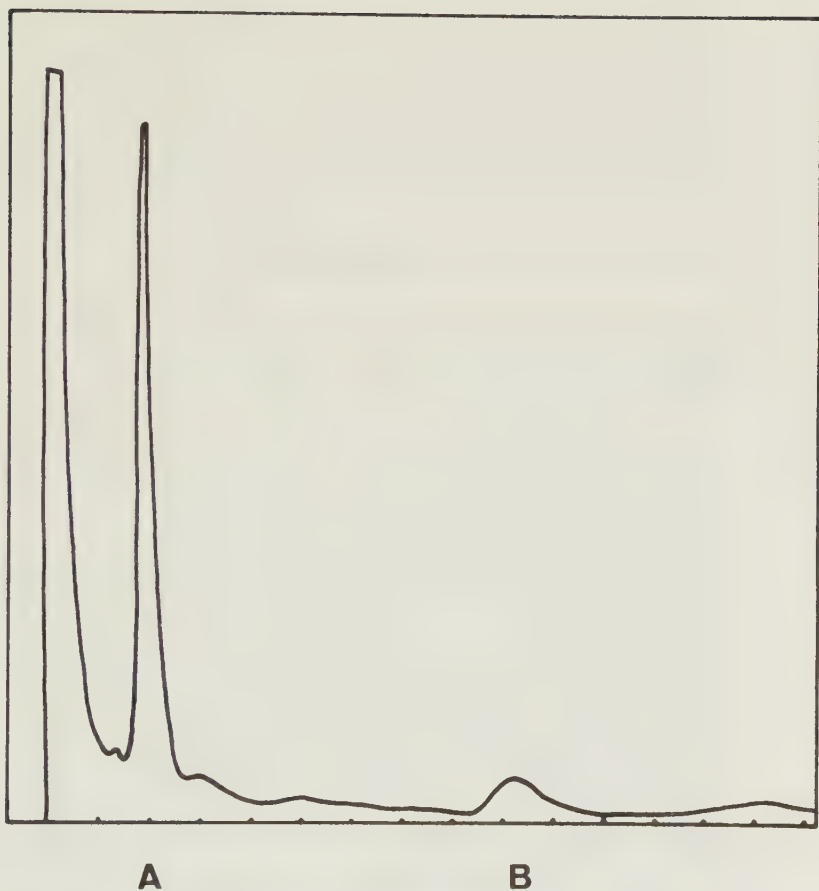


Abb. 22: Gaschromatogramm der Neutralzucker aus dem LPS der
INCO-resistenten Mutante 16-2/3.
Säulentemperatur: 165°C isotherm. Einheit 2 min.
A = Rhamnose, B = nicht identifiziert.

Die O-spezifische Seitenkette des Wildtyp-LPS wird von einem Rhamnosepolymer gebildet. Nach den bisherigen Befunden kann angenommen werden, daß dies auch bei allen untersuchten Mutanten-LPS der Fall ist. Möglicherweise stellt der INCO-ihage kein geeignetes Selektionsmittel für rough-Stämme dar.

2.3.2.4. Das LPS des Mutantenstammes 16-2/I1

Nach den Ergebnissen der serologischen und biochemischen Analysen ist von den untersuchten Mutanten-LPS das 16-2/I1-LPS dem Wildtyp-LPS am engsten verwandt. Aus einem Vergleich der chemischen Zusammensetzung des 16-2/I1-LPS mit der des 16-2-LPS waren deshalb die weitestgehendsten Aufschlüsse über die für die Rezeptoraktivität des 16-2-LPS verantwortlichen Komponenten zu erwarten. Der durch spezifische Farbttests ermittelte Zucker- und Phosphatgehalt des 16-2/I1-LPS ist in Tab.10 verzeichnet. Er ist innerhalb der Fehlergrenzen mit dem des Wildtyp-LPS identisch.

Komponente	Gewichtsprozent
Rhamnose	43,0
Glucosamin	5,9
KDO	0,6
Phosphat	1,9

Tab. 10 Zucker- und Phosphatgehalt des 16-2/I1-LPS.

Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Gaschromatographie. Andere Fettsäurebestandteile als im Wildtyp-LPS waren nicht nachweisbar.

ein Gaschromatogramm der Neutralzucker wurde bereits in Abb.19 gezeigt. wie beim wildtyp-LPS stellt Mannose den dominierenden Gipfel dar.

Die Abtrennung des PS-Teils des 16-2/I1-LPS vom Lipoid A und die anschließende Reinigung an Sephadex G50 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen 16-2- und 16-2/I1-LPS. Es konnten zwei Fraktionen des 16-2/I1-PS mit einem Molekulargewicht von ca. 8000 D bzw. 900 D isoliert werden.

Nach den bisherigen Ergebnissen haben 16-2- und 16-2/I1-LPS die gleiche chemische Zusammensetzung. Die geringen, aber signifikanten serologischen Unterschiede der beiden LPS spiegeln jedoch geringe strukturelle Unterschiede wider, die möglicherweise durch verschiedene Zuckersubstituenten, z.B. Acetyl- oder Pyruvatgruppen, bedingt sind (DUDMAN & HEIDELBERGER, 1969).

Tatsächlich ergaben entsprechende Tests, daß 16-2-LPS den doppelten Prozentsatz an Acetyl- und Pyruvatgruppen enthält wie 16-2/I1-LPS (Tab.11).

LPS	% Acetyl	% Pyruvat
16-2	0,41	0,32
16-2/I1	0,20	0,15

Tab.11: Acetyl- und Pyruvatgehalt von 16-2- und 16-2/I1-LPS.

Wegen ihres geringen Gewichtsprozentsatzes kommen diese Substituenten nur als core-Bestandteile in Frage.

Die Rezeptoraktivität des 16-2-LPS für den INCO-Phagen ist demnach an Acetyl- und/oder Pyruvatgruppen im Kernbereich des LPS gebunden.

V. Diskussion

Die Schwerpunkte dieser Arbeit lagen auf zwei Themenkreisen. Im ersten Teil wurde die chemische Zusammensetzung der LPS der beiden aus Lupinenwurzelknöllchen isolierten Bakterienstämme 16-2 und R.lupini D75 untersucht. Im Vordergrund des zweiten Teils stand die Wechselwirkung des 16-2-LPS mit einem defekten Bakteriophagen (INCO).

1. Die LPS der Stämme 16-2 und R.lupini D75

1.1. Aufbau der LPS

Nach ihren UV-Spektren enthalten die gereinigten LPS-Präparationen der Stämme 16-2 und R.lupini D75 keine Protein- oder Nukleinsäureverunreinigungen, was im allgemeinen als ausreichendes Reinheitskriterium gilt. Elektronenmikroskopisch bestehen beide LPS vorwiegend aus bandförmigen, oftmals verzweigten Strukturen. Diese für viele LPS charakteristische Morphologie kommt wahrscheinlich durch eine Polyaggregation der LPS-Moleküle im wässrigen Milieu zustande (WILKINSON, 1977).

Der Aufbau des 16-2-LPS und des D75-LPS aus einem Lipoid A und einer kovalent daran gebundenen Zuckerkette entspricht den heute verbreiteten Vorstellungen über die Struktur von LPS-Molekülen. Wie andere LPS lassen sich 16-2-LPS und D75-LPS durch milde Hydrolyse mit Essigsäure in unlösliches Lipoid A und lösliches Polysaccharid spalten.

Die PS-Fraktion des 16-2-LPS besteht aus zwei Zuckerketten mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die sich gelchromatographisch auftrennen lassen: Man erhält ein PS mit einem Molekulargewicht von ca. 8000 D und ein OS mit einem Molekulargewicht von ca. 900 D. Derartige Elutionsprofile sind

typisch für PS-Fractionen aus den LPS von smooth-Stämmen. Die OS stellen dabei wahrscheinlich die core-Region des LPS dar und entstehen bei der Hydrolyse solcher LPS-Einheiten, die keine O-spezifischen Seitenketten tragen (WILKINSON, 1977). PLANQUE & KIJNE (1977) konnten aus der PS-Fraktion von R. leguminosarum-LPS neben den vom LPS stammenden Zuckerketten ein weiteres Saccharid isolieren, das vorwiegend aus einer Zuckerkomponente (80 - 90 % Glucose) bestand und von den Autoren als Mikrokapselsaccharid bezeichnet wurde. Obwohl das 8000 D-Polymer aus der PS-Fraktion des 16-2-LPS 72 % Rhamnose enthält, kann es sich hierbei nicht um Kapselmateriale handeln. Während der Reinigung des LPS durch mehrmalige hochtourige Zentrifugation wurden Kapselsaccharide mit dem Überstand verworfen. Durch SDS-Gelelektrophorese wurde zudem nachgewiesen, daß alle PS-Bestandteile der LPS-Präparation lipidgebunden vorliegen.

Die Zuckerkette des D75-LPS bildet gelchromatographisch eine einheitliche Fraktion. Nach dem Molekulargewicht des Zuckerpolymeren von ca. 1400 D ist das D75-LPS wahrscheinlich ein rough- oder semirough-LPS.

Die Lokalisierung der Einzelkomponenten des 16-2- und des D75-LPS erfolgte über einen Vergleich der chemischen Zusammensetzung der LPS und der durch milde Hydrolyse daraus erhaltenen Zuckerketten. Aufgrund der Ergebnisse werden in Anlehnung an das LPS der Enterobacteriaceen (WILKINSON, 1977) folgende Strukturmodelle für 16-2-LPS und D75-LPS vorgeschlagen (Tab.12):

16-2-LPS besteht aus einem Lipid A, das die Fettsäuren β -Hydroxymyristinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, eine Hexadecensäure sowie Glucosamin und Phosphat enthält.

Die PS-Kette besteht aus einem Kern-OS und einer O-spezifischen Seitenkette. Die Neutralzucker Heptose, Glucose und Mannose sind neben KDO, Phosphat und möglicher-

weise Glucosamin die Komponenten des Kern-OS. Die O-spezifische Seitenkette wird ausschließlich von Rhamnose gebildet, die mit 37 % die Hauptkomponente des 16-2-LPS ist. Die eindeutige Lokalisierung des im 8000 D-Polymer nachgewiesenen Glucosaminmoleküls war nicht möglich. Glucosamin ist im 900 D-OS nur in geringen Anteilen enthalten und wäre demnach ein Bestandteil der O-spezifischen Seitenkette. Da eine O-spezifische Seitenkette mit einer einzigen, aus 50 Rhamnose- und 1 Glucosaminmolekül aufgebauten repeating unit jedoch nur schwer vorstellbar ist, ist Glucosamin wahrscheinlich ein Bestandteil der Kernregion. Vielleicht ist das Molekül als Zwischenglied der gesamten Zuckerkette gegen Säureeinwirkung geschützt, als Bestandteil einer ohne O-spezifische Seitenkette vorliegenden Kernregion jedoch nicht. Die in Abb. 3 erkennbare Schulter des 900 D-OS-Gipfels ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das 900 D-OS nicht den vollständigen core des 16-2-LPS, sondern nur ein Abbauprodukt darstellt, dessen Entstehung sich durch säurelabile Bindungen im Kernbereich erklären ließe (WILKINSON, 1977). Das D75-LPS besteht aus einem Lipoid A-Teil und einem OS mit einem Molekulargewicht von ca. 1400 D. Das Lipoid A enthält Glucosamin, β -Hydroxymyristinsäure und die Fettsäuren X1 und X2; Phosphat war nicht nachweisbar. Neben Xylose, Mannose, Galactose und Rhamnose enthält das D75-OS wahrscheinlich eine Didesoxyhexose oder Desoxypentose als weiteren Neutralzuckerbestandteil (Abb. 9, Abb.11). Derartige Zucker sind säurelabil und zerfallen größtenteils bei der Hydrolyse von Polysacchariden (NGHIEM, 1977). Die quantitative gaschromatographische Bestimmung solcher Zucker ist deshalb mit großen Fehlern behaftet. Darüber hinaus enthält das D75-OS Phosphat, Glucosamin und KDO, das wie beim 16-2-LPS bzw. -PS nur in Spuren nachweisbar war. Die geringen Analysenwerte des 16-2- und D75-LPS für KDO können darauf zurückzuführen sein, daß der KDO-Gehalt nicht

LPS-Bestandteile	16-2-LPS		D75-LPS	
	Komponente	mV	Komponente	mV
Lipoid A	3-OH 14:0	4	3-OH 14:0	4
	14:0	1	X1	1
	16:0	1	X2	1
	16:1	1		
	GlcNH ₂	+	GlcNH ₂	+
	PO ₄	+		
Kernbereich	KDO	0-1	KDO	0-1
	Hep	1		
	Glu	2		
	Man	3	Man	1
			Gal	1
			xyl	1
			Rha	5
	GlcNH ₂	1	GlcNH ₂	1
	PO ₄	1	PO ₄	2
O-spez. Seitenk.	Rha	49	? (§)	

Tab.12: Vergleich der chemischen Zusammensetzung von 16-2- und D75-LPS. mV = molares Verhältnis.
§: Ob D75-LPS ein rough- oder semirough-LPS ist, könnte nur mit genetischen Methoden geklärt werden. Einige der als Komponenten des Kernbereichs angegebenen Bestandteile könnten deshalb Bestandteile einer O-spezifischen Seitenkette sein.

quantitativ gemessen wurde. Bei der KDO-Bestimmung mit der Thiobarbitursäuremethode (WARAVDEKAR & SASLAW, 1959) werden nur diejenigen KDO-Moleküle erfaßt, deren vicinale Hydroxyl-

gruppen nach 8 min Säurehydrolyse frei, d.h. durch Perjodat oxydierbar sind. Eine weitere Fehlerquelle dieses Tests besteht in einer möglichen Verfälschung der Meßwerte durch störende Begleitsubstanzen (PLANQUE et al., 1979). Auch durch Rhamnose, den Hauptbestandteil des 16-2- und des D75-LPS, scheint die Bestimmung beeinträchtigt zu werden (LODDERSTAEDT, unveröffentlicht).

1.2. Verwandtschaftsgrad von 16-2-LPS und D75-LPS

Die chemische Zusammensetzung von Lipoid A und Kernbereich ("basale Zucker") ist innerhalb der LPS der Enterobacteriaceen-Gattungen konstant oder nur wenig variabel (LÜDERITZ, 1970) und deshalb ein taxonomisches Merkmal dieser Bakterien. Ob dieses Prinzip auch in anderen Genera verwirklicht ist, ist noch nicht verifiziert. Nach WILKINSON (1977) können jedoch die in den LPS vorhandenen Fettsäuren als taxonomische Indikatoren gelten. Von einem Vergleich des 16-2-LPS mit dem D75-LPS waren deshalb Aufschlüsse über den Verwandtschaftsgrad des nicht nodulierenden Stammes 16-2 mit dem nodulierenden Stamm R.lupini D75 zu erwarten.

Sowohl im Kernbereich als auch im Lipoid A treten signifikante Unterschiede zwischen den beiden LPS auf (Tab.12). Die im 16-2-LPS nachweisbaren Kernbestandteile KDO, Mannose, Phosphat und Glucosamin finden sich auch im core des D75-LPS. Heptose und Glucose sind nur im 16-2-LPS vorhanden. Zusätzlich zu den dem 16-2-OS gemeinsamen Komponenten enthält das D75-OS die Neutralzucker Galactose, Xylose und Rhamnose. Sowohl im 16-2-LPS als auch im D75-LPS ist ist β -Hydroxymyristinsäure der Hauptbestandteil des Lipoid A. Die daneben im 16-2-LPS vorliegenden Fettsäurekomponenten sind im D75-LPS nur in geringen Mengen nachweisbar und stellen wahrscheinlich Verunreinigungen dar.

Darüber hinaus scheinen die im 16-2-LPS und im D75-LPS vorhandenen gemeinsamen Komponenten keine identischen oder ähnlichen immunodominanten Strukturen auszubilden. Serologische Kreuzreaktionen zwischen den beiden LPS waren nicht zu beobachten (NORDHOFF et al., 1978).

Die aufgezeigten Unterschiede in den LPS von 16-2 und D75 machen eine Verwandtschaft der beiden Stämme sehr fraglich. Möglicherweise stellt der Stamm 16-2 ein Bodenbakterium dar, das lediglich zu einer engen Assoziation mit Pflanzenwurzeln neigt.

1.3. Vergleich mit den LPS von Rhizobien und anderen Bodenbakterien

Wie R.trifolii 24SM-LPS (RUSSA & LORKIEWICZ, 1974) und R.leguminosarum A171-LPS (PLANQUE et al., 1979) enthalten 16-2-LPS und D75-LPS einen hohen Anteil an Hydroxyfettsäuren. Die Retentionszeiten der beiden nicht identifizierten Fettsäuren X1 und X2 des D75-LPS liegen im Bereich der Retentionszeiten von längerkettigen gesättigten Fettsäuren (20:0, 22:0) und von α -Hydroxyfettsäuren mit mehr als 14 C-Atomen (2-OH 16:0, 2-OH 18:0), sind jedoch nicht identisch mit diesen. Möglicherweise handelt es sich bei X1 und X2 um β -Hydroxypalmitinsäure (3-OH 16:0) und ϵ -Hydroxystearinsäure (3-OH 18:0), die in hohen Prozentsätzen in den LPS von R.trifolii 24SM (nur 3-OH 16:0; RUSSA & LORKIEWICZ, 1974), R.leguminosarum A171 (PLANQUE et al., 1979) und Agrobacterium tumefaciens (SALKINOJA-SALONEN & BOECK, 1978) auftreten. Um zu klären, ob ein hoher Gehalt an β -Hydroxyfettsäuren ein Merkmal der Rhizobium-LPS ist, sind Fettsäureanalysen der LPS weiterer Species notwendig.

Die prominenteste Komponente des 16-2-LPS und des D75-LPS ist Rhamnose (37 % bzw. 18,5 %). Auch bei R.trifolii wurde

beschrieben, daß jeweils ein Zucker den Hauptanteil des LPS bildet. So enthält R.trifolii TA1 20 % Fucose (HUMPHREY & VINCENT, 1969) und R.trifolii XSM 86 % Glucose (ZAJAC et al., 1975a,b).

Nach GRAHAM & O'BRIEN (1968) ist Rhamnose Bestandteil aller LPS der von ihnen untersuchten 25 Agrobacterium- und Rhizobium-Stämme. In den LPS zweier R.trifolii-Stämme (HUMPHREY & VINCENT, 1969) und von R.leguminosarum A171 (PLANQUE et al., 1979) wurde jedoch keine Rhamnose gefunden. Rhamnose ist auch eine häufig vorkommende Zuckerkomponente der LPS pflanzenpathogener Bakterien und erreicht besonders im xanthomonas-LPS ähnlich hohe Gewichtsanteile wie im 16-2-LPS (VOLK, 1968). Die neben Rhamnose häufigsten im xanthomonas-LPS vorkommenden Neutralzuckerbestandteile Mannose und Glucose (VOLK, 1968) sind auch Komponenten des 16-2-LPS, das damit eine große Ähnlichkeit zu xanthomonas-LPS aufweist. Die Aldohexosen Glucose, Mannose und Galactose sind jedoch auch in den LPS von R.trifolii (Glucose, Mannose: HUMPHREY & VINCENT, 1969; Glucose, Mannose, Galactose: ZAJAC et al., 1975a,b) und R.leguminosarum (ZAJAC et al., 1975b; PLANQUE et al., 1979) zu finden. Die im D75-LPS nachgewiesene Xylose ist auch ein Zuckerbestandteil der LPS von R.trifolii und R.leguminosarum (ZAJAC et al., 1975b).

Die Abwesenheit von Heptose schließlich scheint bei LPS von Bodenbakterien nicht ungewöhnlich zu sein.

Wie beim D75-LPS konnte ~~in~~ in den LPS von R.trifolii (HUMPHREY & VINCENT, 1969) und von Pseudomonas- und xanthomonas-Stämmen (WILKINSON, 1977) Heptose nicht nachgewiesen werden.

Die bisherigen Untersuchungen ergeben noch kein klares Bild der Zuckerzusammensetzung von Rhizobien-LPS. Die im 16-2-LPS und im D75-LPS nachgewiesenen Zuckerbausteine

sind aber auch in den LPS anderer Rhizobienstämme enthalten. 16-2-LPS scheint mehr Gemeinsamkeiten mit Xanthomonas-LPS zu besitzen als mit Rhizobium-LPS.

1.4. Ausblick

Die bei der Symbiose von Rhizobien und Leguminosen wirksamen Erkennungsmechanismen werden nach heutigen Vorstellungen durch spezifische Wechselwirkungen zwischen bakteriellen und pflanzlichen Oberflächenstrukturen bestimmt. Sowohl die EPS als auch die LPS der Bakterien scheinen an diesen Erkennungsmechanismen beteiligt zu sein. Als Bindungspartner der Bakterien auf der wurzelhaaroberfläche kommen Lektine in Frage (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974; DAZZO & BRILL, 1977). Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Lektinen und Oberflächenantigenen der Rhizobien zeigen jedoch teilweise widersprüchliche Ergebnisse. WOLPERT & ALBERSHEIM (1976) stellten fest, daß eine spezifische Bindung nur der LPS von R.leguminosarum, R.phaseoli, R.spp., und R.japonicum an die Lektine der entsprechenden Wirtspflanzen stattfindet. BUVANESWARI et al. (1977) und KAMBERGER (1979a) wiesen dagegen eine spezifische Bindung von R.japonicum-EPS an Glycine-Lektin nach. Darüber hinaus ist aber auch eine bestimmte chemische Zusammensetzung des R.japonicum-LPS für die Ausbildung der Symbiose notwendig (MAIER & BRILL, 1978). Neuere Untersuchungen von KAMBERGER (1979b) schließlich deuten darauf hin, daß EPS und LPS von R.leguminosarum an verschiedenen Erkennungsschritten der R.leguminosarum/Pisum sativum-Symbiose beteiligt sind. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind Aussagen über die Rolle des D75-LPS bei spezifischen symbiontischen Erkennungsmechanismen noch nicht möglich. Die Wechselwirkung von D75-LPS mit Lupinenlektinen kann erst nach der Isolierung dieser Substanzen untersucht

werden. Mit einem kürzlich aus Lupinensamen isolierten Hämagglutinin (BRÜCKNER, 1979) reagierte das D75-LPS nicht. Eine spezifische Bindung dieses Hämagglutinins an LPS oder EPS anderer Rhizobienstämme wurde bisher allerdings auch nicht nachgewiesen (BRÜCKNER, persönliche Mitteilung). Unabhängig davon bildet die Kenntnis der chemischen Zusammensetzung eines R.lupini-LPS die Grundlage für Vergleiche mit den LPS nicht nodulierender Mutanten. Die Abhängigkeit der Nodulationsfähigkeit von einer bestimmten chemischen Zusammensetzung des R.lupini-LPS wäre ein deutlicher Hinweis auf dessen Beteiligung an den symbiontischen Erkennungsvorgängen. Durch den Vergleich des Wildtyp-LPS mit den LPS nicht nodulierender Mutanten wäre eine Eingrenzung der für die Wirtsspezifität entscheidenden LPS-Bereiche möglich. Die Auswahl der dazu geeigneten Mutanten-LPS mit möglichst hohem Verwandtschaftsgrad zum Wildtyp-LPS kann über serologische Analysen und über die Typisierung der Mutanten mit einem Satz LPS-spezifischer Phagen erfolgen.

2. Die Wechselwirkung zwischen 16-2-LPS und INCO

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Beobachtung, daß die bakterizide Aktivität von INCO-Partikeln nur vom isolierten 16-2-LPS reduziert wurde, nicht aber von den LPS der INCO-resistenten Stämme 16-2/I1 und 16-3. 16-2-LPS wurde deshalb als Rezeptorsubstanz für den INCO-Phagen angesehen (PFISTER & LODDERSTAEDT, 1977).

2.1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Wechselwirkung zwischen 16-2-LPS und INCO-Phagen konnte elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Nach Inkubation mit 16-2-LPS waren an den LPS-Strängen adsor-

bierte und kontrahierte INCO-Partikel zu beobachten. Die Adsorption der INCO-Phagen erfolgt spezifisch an das LPS des sensitiven Stammes 16-2, nicht jedoch an LPS des INCO-resistenten Stammes 16-2/I1. Alle bei der Adsorption an 16-2-Zellen auftretenden Konformationsänderungen des INCO-Phagen (LOTZ & MAYER, 1972) werden auch durch isoliertes 16-2-LPS ausgelöst: Die Schwanzfasern der kontrahierten INCO-Partikel sind auf die LPS-Bänder ausgerichtet; der Abstand der Basisplatte von den LPS-Strängen entspricht etwa der Länge der Schwanzfasern. Die von SMIT et al. (1969) beobachteten Strukturveränderungen von Proteus vulgaris-LPS nach der Adsorption eines Proteus-Bacteriocins waren nach der Adsorption der INCO-Phagen am 16-2-LPS nicht erkennbar. Parallel dazu war ein enzymatischer Abbau der Zuckerkette des 16-2-LPS durch den INCO-Phagen nicht nachweisbar (PFISTER & LODDERSTAEDT, 1977).

2.2. Rezeptoraktive Region für den INCO-Phagen

Aus der Literatur sind zwei Versuche zur Eingrenzung des rezeptoraktiven Bereichs auf den LPS-Rezeptoren phagen-ähnlicher Bacteriocine bekannt. Durch Vergleich der LPS resistenter und sensibler P.vulgaris-Stämme konnten SMIT et al. (1969) die Rezeptoraktivität für das Proteus-Bacteriocin 45 einem Glucuronsäuremolekül des LPS zuordnen. IKEDA & EGAMI (1973) schließlich wiesen nach, daß die Rezeptoraktivität für Pyocin R an Pseudomonas aeruginosa-LPS gebunden ist.

Die Lokalisierung der INCO-rezeptoraktiven Region auf dem 16-2-LPS erfolgte auf zwei Wegen:

Zunächst wurde das LPS mit spezifisch wirkenden chemischen Agentien gezielt verändert. Die Auswirkung dieser Agentien auf die Rezeptoraktivität erlaubte Rückschlüsse auf die Lage des rezeptoraktiven Bereichs. Demnach ist die Rezeptoraktivität des 16-2-LPS an den PS-Teil des

LPS gebunden. Während durch die Agentien Perjodat, Essigsäure, Bariumhydroxid und Hydrazin chemische Veränderungen des LPS erfolgen, wird durch die Einwirkung von DOC lediglich die micellare Struktur des LPS zerstört. Auch dadurch konnte die INCO-Adsorption verhindert werden. Da die Adsorption und Kontraktion der INCO-Phagen ein komplexer Vorgang ist, der die definierte Ausrichtung eines Basisplattenrezeptors und der Rezeptoren für die 6 Schwanzfasern erfordert (LOTZ & MAYER, 1972), sind die in den LPS-Micellen vorliegenden sterischen Gegebenheiten wahrscheinlich für die Erhaltung der Rezeptoraktivität des 16-2-LPS notwendig. Obwohl die durch Auftropfen auf einen Rasen sensibler Bakterien bestimmte bakterizide Aktivität einer INCO-Suspension in 1 % DOC sich nicht von der einer unbehandelten Kontrolle unterscheidet, ist jedoch auch eine Störung der Wechselwirkung durch die Anwesenheit des DOC nicht gänzlich auszuschließen.

Eine weitere Eingrenzung des rezeptoraktiven Bereichs wurde durch serologische und biochemische Vergleiche des Wildtyp-LPS mit den LPS INCO-resistenter Mutanten erreicht. Kolonieform der Mutantenstämme und biochemische Analysen der Mutanten-LPS deuteten darauf hin, daß der smooth-Charakter des 16-2-LPS in den LPS der isolierten Mutanten erhalten geblieben war. Anscheinend können die meisten spontan entstandenen rough-Mutanten des Stammes 16-2 noch durch INCO-Partikel abgetötet werden. Wenn dies der Fall ist, dann kann die INCO-Rezeptorregion nicht in der O-spezifischen Seitenkette des 16-2-LPS liegen.

Unter den untersuchten Mutanten-LPS war das LPS des Stammes 16-2/11 dem Wildtyp-LPS serologisch und im Rhamnosegehalt am ähnlichsten. Signifikante Unterschiede in der chemischen

Zusammensetzung von 16-2- und 16-2/11-LPS waren zunächst nicht erkennbar. Wie bei 16-2-LPS ließen sich durch milde Hydrolyse vom Lipid A des 16-2/11-LPS zwei Zuckerketten mit Molekulargewichten von ca. 8000 D und ca. 900 D abtrennen. Rhamnose-, Glucosamin- und Phosphatgehalt des 16-2/11-LPS unterscheiden sich innerhalb der Fehlergrenzen nicht von denen des 16-2-LPS. Die Ergebnisse serologischer Tests deuteten jedoch auf einen geringen, aber signifikanten Unterschied in der Struktur der beiden LPS hin. Solche serologischen Unterschiede können auf eine unterschiedliche Substituierung der Zuckerkomponenten eines Polysaccharids mit Acetyl- und Pyruvatgruppen zurückzuführen sein, die einen starken Einfluß auf die Immundeterminanten von Polysacchariden haben können (DUDMAN & HEIDELBERGER, 1969). Tatsächlich ergaben Tests auf Pyruvat- und Acetylgruppen der 16-2- und des 16-2/11-LPS, daß 16-2-LPS einen doppelt so hohen Prozentsatz an Acetyl- und Pyruvatgruppen enthält als 16-2/11-LPS. Nach den geringen Analysenwerten müssen diese Substituenten Bestandteile des Kernbereichs sein. Der Unterschied des 16-2-LPS und des 16-2/11-LPS bezüglich ihrer serologischen Eigenschaften und ihres Verhaltens gegenüber dem INCO-Phagen konnte demnach auf die Anwesenheit von Acetyl-/Pyruvatgruppen im core-Bereich zurückgeführt werden.

V. Literaturverzeichnis

ATKINS, L.J., and A.H.HAYES

J.Gen.Microbiol. 73, 273-278 (1972)

BARNET, Y.M., and J.M.VINCENT

J.Gen.Microbiol. 61, 319-325 (1970)

BHUVANESWARI, T.V., PUEPKKE, S.G., and W.D.BAUER

Plant Physiol. 60, 486-491 (1977)

BOHLOOL, B.B., and E.L.SCHMIDT

Science 185, 269-271 (1974)

BRUCKNER, M.

Dielectric and mechanical changes, in Vorbereitung (1977)

BUNN, C.R., McNEILL, J.J., and G.H.ELKAN

J.Bact. 102, 24-29

DAZZO, F.B., and D.H.HUBBELL

Appl.Microbiol. 30, 1017-1033 (1975)

DAZZO, F.B., and W.J.BRILL

Appl.Environmental Microbiol. 33, 132-136 (1977)

DISCHE, Z., and L.B.SHETTLES

J.Biol.Chem. 175, 595-603 (1948)

DUBOIS, M., GILLES, K.H., HAMILTON, J.K., REBERS, A.A., and

R.SMITH

Anal. Chem. 28, 350-356 (1955)

DUDMAN, W.F., and M.HEIDELBERGER

Science 164, 954-955 (1969)

EISENSTARK, A.

In: K.Maramorosch and H.Koprowski (ed.), Methods in Virology,
Vol. 1, 449-524, Academic Press, New York. (1967)

GRAHAM, P.H., and M.A.O'BRIEN

A.v.Leeuwenhoek 34, 326-330 (1968)

HESTRIN, S.

J.Biol.Chem. 180, 249-261 (1949)

- HUMPHREY, B., and J.M.VINCENT
J.Gen.Microbiol. 59, 411-425 (1969)
- IKEDA, K., and F.EGAMI
J.Gen.Appl.Microbiol. 19, 115-128 (1973)
- JANN, B., RESKE, K., and K.JANN
Eur.J.Biochem. 60, 239-246 (1975)
- KAMBERGER, W.
Arch.Microbiol. 121, 83-90 (1979a)
- KAMBERGER, W.
FEBS Letters, im Druck (1979b)
- LOTZ, W., and F.MAYER
J.Virol. 9, 160-173 (1972)
- LOTZ, W.
In: F.E.Hahn (ed.), Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 4, 53-102, Springer-Verlag Berlin (1976)
- LOWRY, O.H., ROBERTS, N.R., LEINER, K.Y., WU, M.L., and A.L.FARR
J.Biol.Chem. 207, 1 ff. (1954)
- LUDERITZ, O.
Angew.Chem. 82(18), 708-722 (1970)
- MAIER, R.J., and W.J.BRILL
J.Bact. 133(3), 1295-1299 (1978)
- METCALFE, L.D., and A.A.SCHMITZ
Anal.Chem. 33, 363 (1961)
- NETER, E.
Bacteriol.Rev. 20, 166 (1956)
- NGHIEM, H.-O.
Eur.J.Biochem. 75, 613-618 (1977)
- NORDHOFF, H.-B., LODDERSTAEDT, G., and W.HEUMANN
XII.Int.Congr.Microbiol., Sept. 3-8, München (1978)

OSBORN, M.J., GANDER, J.E., PARISI, E., and J. CARSON
J.Biol.Chem. 247, 3962-3972 (1972)

OZEKI, H.

In: K.Maramorosch and H.Koprowski (ed.), Methods in Virology,
Vol. 1V, 565-592, Academic Press, New York (1968)

PARTRIDGE, S.M.

Nature 164, 443 (1969)

PFISTER, H.

Diplomarbeit Universität Erlangen (1973)

PFISTER, H., und W.LOTZ

Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A228, 179-182 (1974)

PFISTER, H., and G.LODDERSTAEDT

J.Gen.Virol. 37, 337-347 (1977)

PFISTER, H., and H.-J.BURKARDT

J.Ultrastruct.Res. 64, 159-172 (1978)

PLANQUE, K., and J.W.KIJNE

FEBS Letters 73, 64-66 (1977)

PLANQUE, K., van NIEROP, J.J., BURGERS, A., and S.G.WILKINSON

J.Gen.Microbiol. 110, 151-159 (1979)

PREHM, P.

Dissertation Universität Freiburg (1974)

RUSSA, R., and Z.LORKIEWICZ

J.Bact. 119, 771-775 (1974)

SALKINOJA-SALONEN, M., and R.BOECK

J.Gen.Microbiol. 105, 119-125 (1978)

SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H., and A.JEANES

Anal.Chem. 12, 1602-1604 (1965)

SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., and J.V.MAIZEL

Biochem. Biophys.Res.Comm. 28, 815-820 (1967)

- SLONEKER, J.H., and D.G. ORENTAS
Nature 194, 478-479 (1962)
- SMIT, J.A., HUGO, N., and H.C. de KLERK
J.Gen.Virol. 5, 33-37 (1969)
- STROMINGER, J.L., PARK, J.T., and R.E. THOMSEN
J.Biol.Chem. 234, 3263-3268 (1959)
- VALENTINE, C., SHAPIRO, B.M., and E.R. STADTMAN
Biochemistry 7, 2143-2152 (1968)
- VOLK, W.A.
J.Bact. 95(3), 980-982 (1968)
- WARAVDEKAR, V.S., and L.D. SASLAW
J.Biol.Chem. 234, 1945-1950 (1959)
- WATANABE, K., and S. TAKESUE
J.Gen.Virol. 28, 29-35 (1975)
- WESTPHAL, O., and K. JANN
In: R.L. Whistler (ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry,
Vol. V, 83-91, Academic Press, New York (1965)
- WILKINSON, S.G.
In: I. Sutherland (ed.), Surface Carbohydrates of the Pro-
karyotic Cell, 97-175, Academic Press, London (1977)
- WOLPERT, J.S., and P. ALBERSHEIM
Biochem.Biophys.Res.Comm. 70, 729-737 (1976)
- ZAJAC, E., RUSSA, R., and Z. LORKIEWICZ
J.Gen.Microbiol. 90, 365-367 (1975a)
- ZAJAC, E., RUSSA, R., and Z. LORKIEWICZ
Acta Microbiol.Pol., Ser.A, Vol. VII (24), No.4, 181-185 (1975b)

Die vorliegende Arbeit, die einen Beitrag zur Frage der Wirtsspezifität von Rhizobien darstellt, wurde im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogrammes "Stoffwechsel anorganischer Stickstoff- und Schwefelverbindungen" geplant und durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Heumann möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit danken. Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. B. Jann und Herrn Prof. Dr. K. Jann für die freundliche Einweisung in den Umgang mit Lipopolysacchariden sowie Frau Dr. I. Fromme für die Einführung in gaschromatographische Methoden. Ferner danke ich allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie, die mir in Einzelfragen geholfen haben.

Lebenslauf

Name: Günter Lodderstaedt

Geburtstag: 21.04.1947

Geburtsort: Fürth/Bay.

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Eltern: Rudolf Schäffer, Bauhelfer, und
Irmgard Lodderstaedt, verw. Lapinski, geb. Krenn

Schulen: 1953 - 1957 Volksschule Fürth
1957 - 1966 Hardenberg-Gymnasium Fürth
19.07.1966 Reifezeugnis

Wehrdienst: Okt. 1966 - Sept. 1968

Studium: Okt. 1968 - Febr. 1975 Studium der Biologie
an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
08.01.1973 Diplom-Biologen-Vorprüfung
26.02.1975 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Diplomarbeit: Biochemische Untersuchung
des Filaments der komplexen Geißeln von
Rhizobium lupini H13-3

(Günter Lodderstaedt)

